



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**

BSfZa`àY[Wfaj [Lb`àY[W9é` éf[cgWw@gfdf]a`

---

**Présentée et soutenue par :**

Laëtitia Théron

**le :** 21 novembre 2011

**Titre :**

Déterminisme biologique de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du  
foie gras de canard

---

**Ecole doctorale :**

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

**Unité de recherche :**

UMR 1289 TANDEM

**Directeur(s) de Thèse :**

Xavier Fernandez : Directeur de Recherches INRA Ž ;@BF

**Rapporteurs :**

Françoise Médale : Directrice de Recherches INRA

François Le Naour : Directeur de Recherches INSERM

**Membre(s) du jury :**

Florence Gondret : Chargée de Recherches INRA

Caroline Molette : Maître de Conférences INPT-ENSAT

Thierry Astruc : Ingénieur d'Etudes INRA



*Je dédie ce travail  
à ma famille d'ici et d'ailleurs,  
à Masc,  
et à mes ami(e)s*

*pour leur confiance et leur soutien  
quel que soit mon chemin.*

## *Remerciements*

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR INRA – INP Toulouse (ENSAT), Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystèmes et Métabolisme et de l'UR Qualité des Produits Animaux, INRA de Theix. Je remercie toutes les personnes qui ont permis sa réalisation.

Je remercie M. Xavier Fernandez, Directeur de Recherches à l'INRA, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, et endossé le rôle de directeur de thèse.

Je remercie Françoise Médale, Directrice de Recherches à l'INRA, et François Le Naour, Directeur de Recherches à l'INSERM, pour avoir bien voulu participer au jury de thèse et juger ce travail en tant que rapporteurs, et Florence Gondret, Chargée de Recherches à l'INRA, pour avoir bien voulu participer au jury de thèse et juger ce travail en tant qu'examinatrice.

LT1001, c'est encadré.

Aussi, je remercie chaleureusement mes chefs, directeur de thèse, encadrants et autres : Annie Vénien, Xavier Fernandez, Zulma Vitezica, Caroline Molette, Michel Bouillier-Oudot, et Thierry Astruc (par ordre alphabétique de la deuxième lettre du nom de famille). Un grand merci pour avoir bien voulu de moi dans cette aventure, pour vos conseils scientifiques, et moins scientifiques, votre patience, votre disponibilité, votre humour et votre sympathie.

Merci Annie pour l'apprentissage de l'analyse d'images et autres techniques d'immuno, pour votre gentillesse, et le ravitaillement en chocolat et autres !

Merci Xavier pour votre confiance, pour tout ce que vous m'avez appris, et votre fair-play rugbalistique, et le poster bien-sûr !

Merci Zulma pour l'initiation à R et à tout le reste, ton accent, ta générosité et le dulce de leche !

Merci Caroline pour tous tes conseils et ta disponibilité. Chose promise, chose due : toutes mes excuses à M. Yann, Melle Emilie et M. Benjamin pour avoir accaparé Me Molette !

Merci Michel pour les discussions si enrichissantes, votre gentillesse et votre fauteuil en skaï légèrement bancal...

Merci Thierry pour l'initiation à la microscopie, ta constante bonne humeur et merci de parvenir à me donner le sourire en toutes circonstances !

LT1001, c'est convivialité.

Un grand nombre de personnes a permis la réalisation de ce travail, aussi j'espère n'oublier personne.

Je tiens à remercier Geneviève Bénard et Alain Kondjoyan pour leur participation aux comités de thèse, et également Céline Peillod, Aurélie Lucan, Stéphane Davail, René Babilé, François Aguer et Christophe Aromatario pour leur participation aux comités de pilotage du projet 'Fonte'. Leurs conseils et propositions ont été précieux dans la réalisation de ce travail.

Je remercie l'ensemble du personnel du lycée agricole de Périgueux, en particulier François Héraud. Merci pour l'accueil, l'organisation et la convivialité des manips, et les rillettes !

J'adresse mes plus chaleureux remerciements aux plateformes de spectrométrie de masse de Toulouse et de Theix : Carole Pichereaux, Michel Rossignol, Christophe Chambon et Didier Viala. Merci pour tout le travail accompli, pour vos précieux conseils et votre aide.

Merci à Alain Vignal pour avoir fourni une base de données « canard » et Christine Rousseau pour l'avoir mise en forme.

Je remercie également Brigitte Gaillard-Martinie du plateau technique de microscopie de l'INRA de Theix pour son accueil et sa gentillesse.

Je remercie également Frédéric Jamme et Matthieu Réfrégiers de la ligne DISCO et Paul Dumas de la ligne SMIS du synchrotron SOLEIL. Un grand merci pour votre accueil, votre bonne humeur et votre disponibilité.

Je remercie vivement l'ensemble des personnels des équipes dans lesquelles s'est déroulée cette thèse.

Un grand merci à M2H de l'INRA de Theix : Frédéric Peyrin - chargé de muscler mes arguments, et Roland Labas - pour son initiation à l'histologie.

Un grand merci à Promété de l'UMR TANDEM : Nathalie Marty-Gasset - ma maîtresse de protéomique pour ton amitié, ton soutien et tout ce que la pudeur m'empêche d'évoquer ici, Hélène Manse - pour sa gentillesse et sa disponibilité, Corinne Pautot - pour toute son aide et son sourire, Stéphane Seidlinger - pour toute son aide et la brioche du matin, Hervé Rémignon et Alain Auvergne - pour la richesse de leurs discussions. Un grand merci aux jeunes, colocs de bureau et autres compagnons de labo : Christine Julien, Katia Julian, Julien Arroyo, Mickaël Rey, Marco Cullere, Carole Arnoux, Sahar Awde, Amandine Desfrétières, Souleyman Traore, Aurélie Guerra, Madonna Chin, Romain Dinis, Anaïs Fernandez, Nina Munsters, Adeline Picot, Anna Concollato, Hélène Benquet et Caroline Gomiero-Casadémont. Et pour finir, je remercie les camarades des soirées filles qui n'ont pas encore été citées: Valérie Monteils, Corine Bayourthe et Séverine Jean. Merci pour votre gentillesse et vos sourires !

LT 1001, c'est supporté.

Je remercie tous mes proches qui ont supporté mes humeurs pendant ces trois années, et les précédentes... Un grand merci à ma famille pour son soutien et sa confiance sans faille. Un grand merci à mes amis d'Aurillac, de Clermont, de Toulouse et partout ailleurs. Merci à ceux qui m'accompagnent depuis un bout de temps et ceux fraîchement rencontrés, les colocs et voisins, sans oublier les anciens de BPM ! Merci Mémère – Claude De Oliveira Ferreira – pour l'hébergement lors de mes visites auvergnates, et pour ton amitié au-delà des volcans ! Merci Couchine Magali Martin et à son blond, pour le dog sitting de mon blond, et pour tout le reste !

Merci à vous tous d'avoir toujours été là, pour votre patience et votre compréhension !

## *Liste des publications*

### Articles relatifs à la thèse :

**Théron L.**, Astruc T., Bouillier-Oudot M., Molette C., Vénien A., Peyrin F., Vitezica Z. G., Fernandez X. (2011). The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck 'foie gras'. *Meat Science*, 89 (4) : 377 – 383.

**Théron L.**, Fernandez X., Marty-Gasset N., Pichereaux C., Rossignol M., Chambon C., Viala D., Astruc T., Molette C. (2011). Proteomic analysis of duck fatty liver during post mortem storage related to the variability of fat loss during cooking of 'foie gras'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (23) : 12617–12628.

**Théron L.**, Cullere M., Bouillier-Oudot M., Manse H., Molette C., Fernandez X., Vitezica Z. G. (2011). Modeling the relationships between quality and biochemical composition of fatty liver in mule ducks. Soumis dans *Journal of Animal Science*.

**Théron L.**, Fernandez X., Marty-Gasset N., Pichereaux C., Rossignol M., Chambon C., Viala D., Astruc T., Molette C. (2011). Identification by proteomic analysis of early *post mortem* markers involved in the variability in fat loss during cooking of mule duck 'foie gras'. A soumettre dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

### Congrès :

**Théron L.**, Pichereaux C., Marty-Gasset N., Chambon C., Rossignol M., Viala D., Fernandez X., Molette C. (2011). Poster : “The mechanisms of fat loss during cooking of 'foie gras': Proteomic analysis of duck fatty liver”. Congrès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP) Avignon, France. 19-22 septembre.

Cerruti C., **Théron L.**, Touboul D., Astruc, T., Brunelle A. (2011). Poster : “Analyse lipidomique de foie gras de canard de différents classements commerciaux à l'aide de l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS”. Congrès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP) Avignon, France. 19-22 septembre.

**Théron L.**, Molette C., Marty-Gasset N., Chambon C., Pichereaux C., Rossignol M., Viala D., Fernandez X. (2011) Communication orale : “The mechanisms of fat loss during cooking of ‘foie gras’: proteomic analysis of duck fatty liver”. ISBN 978-0-85261-930-8. European Cooperation in Science and Technology (COST) Farm Animal Proteomics Spring Meeting. Glasgow, Scotland. 31<sup>st</sup> March-1<sup>st</sup> April.

Molette C., Rémignon H., **Théron L.**, Chambon C., Rossignol M., Pichereaux C., Fernandez X. (2011). Current advances in proteomic analysis of (fatty) liver, European Cooperation in Science and Technology (COST) Farm Animal Proteomics Spring Meeting, Invited speaker. ISBN 978-0-85261-930-8, Glasgow, Scotland. 31<sup>st</sup> March-1<sup>st</sup> April.

**Théron L.**, Molette C., Marty-Gasset N., Chambon C., Pichereaux C., Rossignol M., Fernandez X. (2010). Poster: “Proteomic analysis of duck ‘foie gras’”. 4<sup>th</sup> European Proteomics Association (EuPA) Meeting Estoril, Portugal. 23- 27 octobre.

**Théron L.**, Molette C., Marty-Gasset N., Chambon C., Fernandez X. (2010). Communication orale: “Analyse protéomique du foie gras de canard”. 9<sup>ème</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras (JRPFGBordeaux, France. 7-8 Octobre.

**Théron L.**, Astruc T., Molette C., Vénien A., Bouillier-Oudot M., Peyrin F., Fernandez X. (2010). Communication orale: “Approche histologique de la fonte lipidique du foie gras de canard”. 9<sup>ème</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras (JRPFGBordeaux, France. 7-8 Octobre.

#### Articles antérieurs à la thèse :

**Théron L.**, Sayd T., Pinguet J., Chambon C., Robert N., Santé-Lhoutellier V. (2011). Proteomic analysis of *semimembranosus* and *biceps femoris* muscles from Bayonne dry cured ham. *Meat Science*. 88 (1) : 82-90.

**Théron L.**, Tournayre P., Kondjoyan N., Abouelkaram S., Santé-Lhoutellier V., Berdagué J.L. (2010). Analysis of the volatile profile and identification of odour-active compounds in Bayonne ham. *Meat Science*. 85 (3) : 453-460.

**Théron L.**, Chevarin L., Robert N., Dutertre C., Santé-Lhoutellier V. (2009). Time course of peptide fingerprints in *semimembranosus* and *biceps femoris* muscles during bayonne ham processing. *Meat Science*. 82 (2) : 272-277.

Santé-Lhoutellier V., **Théron L.**, Cepeda M., Grajales A., Gatellier P. (2008). Comparison of proteolysis in native, heat-treated and aged proteins from turkey meat. *British Poultry Science*. 49 (3) : 308-314.



## *Liste des abréviations*

ACC	Acétyl-CoA carboxylase
AGMI	Acide gras mono-insaturé
AGPI	Acide gras poly-insaturé
AGS	Acide gras saturé
CHCA	Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
CID	Collision Induced Dissociation
CY3	Cyanine
DG	Diglycéride
DMPP	Diméthylallyl pyrophosphate
DNPH	2,4-dinitrophénylhydrazine
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EMSC	'Extended Multiplicated Signal Correction'
FABP	'Fatty acid binding protein'
FAS	'Fatty Acid Synthase'
FITC	'Fluoresceine Iso Thio Cyanate'
FNS	Fraction protéique non soluble à faible force ionique
FS	Fraction protéique soluble à faible force ionique
FTIR	'Fourier Transformed InfraRed'
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
HDL	'High Density Lipoprotein'
HES	Hématoxyline Eosine Safran
HMG-CoA	Hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HSP	'Heat Shock Protein'
IDL	'Intermediate Density Lipoprotein'
IPPP	Isopentényl pyrophosphate
LDL	'Low Density Lipoprotein'
LDH	Lactate déshydrogénase
LOO	Linoleyl 1,di-oleyl 2,3 glycerol

LPL	Lipoprotéine lipase
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight
MAT	Matière azotée totale
MDA	Malonic dialdehyde
MG	Monoglycéride
MS	Matière sèche
NAFLD	‘Non Alcoholic Fatty Liver Disease’
OOO	Trioleine
PAI	‘Protein Abundance Index’
PBS	‘Phosphate Buffered Saline’
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
POL	Palmityl 1, oleyl 2, linoleyl 3, glycerol
POO	Palmityl 1, di-oleyl 2,3, glycerol
PoOO	Palmitoleyl 1, di-oleyl 2,3- glycerol
POP	Palmityl 1,3, oleyl 2, glycerol
POS	Palmityl 1, oleyl 2, stearyl 3, glycerol
PPL	Di-palmityl 1,2, linoleyl 3, glycerol
PPP	Tripalmitine
PPS	Di-palmityl 1,2, stearyl 3, glycerol
PS	Phosphatidylsérine
PSS	Palmityl 1, di-stearyl 2,3, glycerol
QTL	‘Quantitative Trait Locus’
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SOO	Stearyl 1, di-oleyl 2,3, glycerol
SPS	Palmityl 2, di-stearyl 1,3, glycerol
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloroacétique
TG	Triglycéride
VLDL	‘Very Low Density Lipoprotein’

# Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des publications .....	6
Liste des abréviations .....	8
Liste des figures.....	18
Liste des tableaux .....	21
Résumé.....	24
Abstract.....	25
Introduction.....	27
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	31
<b>1. Le métabolisme hépatique des oiseaux .....</b>	<b>32</b>
1.1. L'utilisation des lipides alimentaires.....	32
1.2. Le métabolisme glucidique .....	32
1.2.1. Stockage sous forme de glycogène .....	33
1.2.2. Utilisation du glucose.....	33
1.3. La lipogenèse <i>de novo</i> .....	34
1.4. L'exportation des lipides.....	36

## **2. La stéatose hépatique des palmipèdes ..... 38**

2.1. Mécanismes de la stéatose hépatique chez les palmipèdes.....	39
2.2. Modifications associées à la stéatose hépatique.....	40
2.2.1. Modifications structurales associées à la stéatose hépatique .....	40
2.2.2. Modifications de la composition biochimique associées à la stéatose hépatique .....	41
2.2.3. Modifications d'expression de gènes associées à la stéatose hépatique .....	43
2.3. Facteurs génétiques de variation de l'aptitude à la stéatose hépatique.....	44
2.3.1. Les différences entre espèces et genres et leurs mécanismes.....	44
2.3.2. Variabilité génétique et sélection intra-espèce.....	46

## **3. La fonte lipidique à la cuisson du foie gras ..... 47**

3.1. Les enjeux liés à la fonte lipidique à la cuisson .....	47
3.2. Méthodes d'évaluation de la fonte à la cuisson .....	49
3.3. Facteurs de variation de la fonte à la cuisson .....	50
3.3.1. Facteurs biologiques de variation de la fonte lipidique à la cuisson ...	50
3.3.1.1. Déterminisme génétique de la fonte lipidique à la cuisson.....	50
3.3.1.2. Le poids et la composition biochimique .....	51
3.3.1.3. Les facteurs d'élevage .....	52
3.3.2. Facteurs technologiques de la variation de la fonte lipidique à la cuisson.....	54
3.3.2.1. Les facteurs <i>peri mortem</i> .....	54
3.3.2.2. Les facteurs <i>post mortem</i> .....	55

MATERIELS ET METHODES .....	59
-----------------------------	----

## **1. Itinéraire zootechnique ..... 59**

1.1. Elevage et préparation au gavage.....	59
1.2. Gavage.....	60
1.3. Abattage et éviscération .....	60
1.4. Transformation des foies gras .....	60
1.5. Rendement technologique .....	61

## **2. Echantillonnage..... 62**

## **3. Mesures biochimiques ..... 62**

3.1. Détermination du taux de matière sèche .....	62
3.2. Détermination du taux de Matières Azotées Totales (MAT)...	62
3.3. Détermination du taux de lipides .....	63
3.4. Détermination du taux de collagène.....	63
3.5. Dosage de l'acide lactique et du glycogène .....	64
3.5.1. Extraction .....	64
3.5.2. Hydrolyse du glycogène.....	64
3.5.3. Dosage du glucose .....	65
3.5.4. Dosage du lactate .....	65
3.6. Mesure de l'oxydation des lipides.....	65
3.7. Mesure de l'oxydation des protéines.....	66

## **4. Analyse de la fraction lipidique du foie gras.....67**

4.1. Profil en lipides neutres.....67

4.2. Profil en triglycérides .....68

## **5. Analyse protéomique .....69**

5.1. Extraction et dosage des protéines du foie gras .....69

5.1.1. Etapes d'extraction.....69

5.1.2. Dosage des protéines.....70

5.2. Analyse de la fraction protéique soluble à faible force  
ionique en électrophorèse bidimensionnelle .....70

5.2.1. Réhydratation des strips et isoélectrofocalisation .....70

5.2.2. Equilibration .....71

5.2.3. Mise en œuvre de la seconde dimension par SDS-PAGE.....71

5.2.4. Coloration des gels au Bleu Brillant G 250.....71

5.2.5. Analyses informatique et statistique des gels.....72

5.2.6. Identification en Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation  
– Time Of Flight (MALDI-TOF)  
(Plateforme d'exploration du métabolisme, INRA Theix).....72

5.2.7. Identification en nano-LC-ESI-Trappe ionique  
(Plateforme d'exploration du métabolisme, INRA Theix).....74

5.3. Analyse de la fraction protéique non soluble à faible force  
Ionique par la stratégie Shot-Gun (Plateforme de spectrométrie  
de masse, IPBS Toulouse).....75

5.3.1. Séparation des protéines.....75

5.3.2. Hydrolyse enzymatique des protéines.....75

5.3.3. Identification des protéines en nano-LC-MS/MS .....76

5.3.4. Recherche dans les bases de données.....	76
5.3.5. Analyse bioinformatique.....	76
5.4. Validation des protéines candidates par Dot-Blot et Western-Blot.....	77
<b>6. Microscopie et histologie du foie gras.....</b>	<b>78</b>
6.1. Fixation du tissu hépatique et réalisation des coupes.....	78
6.1.1. Cryo-fixation et coupes à congélation.....	78
6.1.2. Fixation chimique et coupes semi- et ultra-fines .....	79
6.2. Colorations histologiques et cytologiques .....	80
6.2.1. Immunomarquage du collagène de type III.....	80
6.2.2. Coloration Hématoxyline – Eosine .....	80
6.2.3. Coloration au Bleu de Toluidine .....	81
6.2.4. Coloration au Rouge de Nile.....	81
6.2.5. Contrastes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.....	81
6.3. Acquisitions en microscopies optique et électronique.....	82
6.3.1. Acquisitions en microscopie optique .....	82
6.3.2. Acquisitions en microscopie électronique (Centre d'Imagerie Cellulaire Santé, Clermont-Ferrand, France).....	82
6.4. Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (Ligne SMIS du synchrotron Soleil) .....	82
6.5. Microspectroscopie Ultraviolet (UV) en rayonnement synchrotron (Ligne DISCO du synchrotron Soleil) .....	83

6.6. Analyses des données .....	83
6.6.1. Analyse des données obtenues à partir des coupes à congélation .....	84
6.6.2. Analyse des données obtenues à partir des échantillons inclus en résine Epoxy .....	84
6.6.3. Prétraitement des données spectrales UV et FTIR .....	84
<b>7. Analyses statistiques .....</b>	<b>85</b>
 RESULTATS .....	 87
<b>1. Echantillonnage .....</b>	<b>87</b>
1.1. Premier volet du projet .....	87
1.2. Second volet du projet .....	88
<b>2. Paramètres zootechniques .....</b>	<b>89</b>
<b>3. Paramètres technologiques .....</b>	<b>89</b>
<b>4. Caractérisations physico-chimique et biochimique .....</b>	<b>90</b>
4.1. Caractéristiques physico-chimiques .....	90
4.2. Composition biochimique .....	90
4.3. Mesure du statut oxydant .....	91
4.4. Mesure de la teneur en glycogène et en acide lactique .....	91
<b>5. Analyse des profils en lipides neutres et en triglycérides .....</b>	<b>91</b>
5.1. Profils en lipides neutres .....	92
5.2. Profils en triglycérides .....	92



## **6. Etude de l'expression différentielle des protéines par analyse protéomique ..... 93**

6.1. Analyse de la fraction protéique soluble à faible force ionique .....	93
6.1.1. Expression différentielle des protéines du foie gras au moment de l'éviscération .....	94
6.1.2. Expression des protéines du foie gras au cours du refroidissement ....	96
6.2. Analyse de la fraction protéique non soluble à faible force ionique .....	99
6.2.1. Expression des protéines du foie gras au moment de l'éviscération ...	99
6.2.2. Expression des protéines du foie gras au cours de la réfrigération .....	101

## **7. Histologie et microscopie..... 103**

7.1. Etude de la structure et de la composition du tissu hépatique .	104
7.1.1. Immuno-marquage du collagène .....	105
7.1.2. Coloration de la matrice non lipidique .....	105
7.1.3. Coloration des lipides .....	106
7.1.4. Combinaison des colorations Bleu de Toluidine et Rouge de Nile.....	107
7.2. Etude de la morphologie des gouttelettes lipidiques.....	108
7.2.1. Morphologie des gouttelettes lipidiques avant la cuisson .....	109
7.2.2. Morphologie des gouttelettes lipidiques après la cuisson .....	110
7.3. Caractérisation du foie gras en microspectroscopies infrarouge et ultra-violet.....	111

7.3.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier .....	111
7.3.1.1. <i>Profils des bandes spectrales d'intérêt de foies gras crus et cuits</i> .....	111
7.3.1.2. <i>Cartographie des bandes spectrales FTIR d'intérêt</i> .....	112
7.3.2. Microspectroscopie Ultraviolet en rayonnement synchrotron .....	113
7.3.2.1. <i>Profils des spectres UV de foies gras crus et cuits</i> .....	113
7.3.2.2. <i>Cartographie des bandes spectrales UV d'intérêt</i> .....	113
DISCUSSION GENERALE.....	116
Caractérisation biochimique des foies gras.....	116
Analyse de l'expression des protéines du foie gras en relation avec le niveau de fonte lipidique à la cuisson.....	119
Observations histologiques du foie gras cru et cuit en relation avec la fonte lipidique à la cuisson.....	128
Synthèse des résultats – Vers une proposition de mécanismes à l'origine de la variabilité de la fonte lipidique du foie gras de canard .....	133
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	141

## *Liste des figures*

- Figure 1** Synthèse du glycogène dans le foie par la voie de la glycogénogenèse (p 32).
- Figure 2** Réactions enzymatiques de la voie de la glycolyse (p 33).
- Figure 3** Réactions enzymatiques du cycle de Krebs (p 34).
- Figure 4** Synthèse des acides gras polyinsaturés à chaîne longue (d'après Numa, 1984) (p 35).
- Figure 5** Voie de synthèse du cholestérol (p 36).
- Figure 6** Mécanismes de développement de la stéatose hépatique chez le canard (d'après Saez, 2009) (p 39).
- Figure 7** Observations histologiques de foie d'oie au cours du (Locsmándi *et al.*, 2007) (p 40).
- Figure 8** Mécanismes de la stéatose chez les palmipèdes (Hermier *et al.*, 1999b) et aptitude à la stéatose hépatique en réponse au gavage des canards de Barbarie (B), Pékin (P), mulard (M) et hinny (H) (Baéza *et al.*, 2005) (p 44).
- Figure 9** Expression de la variabilité de la fonte lipidique du foie gras de canard (p 48).
- Figure 10** Courbes de gavage des deux volets (p 60).
- Figure 11** Stratégie de l'analyse protéomique appliquée à l'étude de la fonte lipidique du foie gras de canard (p 69).
- Figure 12** Les différentes échelles d'observation du foie gras (p 78).
- Figure 13** Analyse des données obtenues selon la coloration des structures portant sur les teintes grisées en comparant les acquisitions réalisées selon le diaphragme partiellement (FC1) ou totalement ouvert (FC2) (p 83).
- Figure 14** Analyse des données relatives aux lipides de réserve (p 83).
- Figure 15** Analyse des données obtenues selon la coloration des lipides portant sur la différence de marquage en fonction du filtre de fluorescence utilisé pour les observations (p 84).
- Figure 16** Etapes de l'analyse des images acquises en microscopie optique à partir des coupes semi-fines (p 84).
- Figure 17** Représentation graphique selon le poids de foie et le rendement technologique des échantillons sélectionnés dans le cadre du premier volet du projet (p 87).
- Figure 18** Représentation graphique selon le poids de foie et le rendement technologique des échantillons sélectionnés pour l'analyse protéomique du volet 1 (p 88).

- Figure 19** Représentation graphique selon le poids de foie et le rendement technologique des échantillons sélectionnés dans le cadre du second volet du projet (p 88).
- Figure 20** Exemple de gel d'électrophorèse bidimensionnelle de foie gras cru du groupe 'Fonte élevée', prélevé à 20 minutes *post mortem* (p 93).
- Figure 21** Résultats des Dot-Blots de la protéine beta-énolase (p 103).
- Figure 22** Immunomarquage du collagène d'une coupe de foie gras (20 minutes *post mortem*) observée en microscopie à épifluorescence (filtre CY3, temps de pose 40 ms) (p 105).
- Figure 23** Images de foie gras prélevé à 20 minutes *post mortem* (p 105).
- Figure 24** Images de foie gras prélevé à 20 minutes *post mortem* (coloration Rouge de Nile observée en fluorescence à l'aide du filtre CY3) (p 106).
- Figure 25** Images de foie gras prélevé à 20 minutes *post mortem* (coloration Rouge de Nile observée en fluorescence à l'aide du filtre FITC) (p 106).
- Figure 26** Taux de matrice spécifiques aux filtres FITC et CY3, selon le temps de prélèvement et le niveau de fonte (p 107).
- Figure 27** Images de foie gras prélevé à 20 minutes *post mortem* (coloration au Bleu de Toluidine observée en fond clair (A), et au Rouge de Nile observée en épifluorescence à l'aide des filtres CY3 (B) et FITC (C) (p 107).
- Figure 28** Images de foies gras prélevés à 20 minutes *post mortem*, avant cuisson(A) et après cuisson (B) (coloration au Bleu de Toluidine) (p 108).
- Figure 29** Morphologie des gouttelettes lipidiques de foie gras prélevé avant cuisson, observée en microscopie optique (A) et électronique (B, C et D) à partir des inclusions en résine (p 109).
- Figure 30** Morphologie des gouttelettes lipidiques de foie gras prélevé après cuisson, observée en microscopie optique (A) et électronique (B, C et D) à partir des inclusions en résine (p 110).
- Figure 31** Relation entre l'indice de forme et l'aire des gouttelettes lipidiques (en  $\mu\text{m}^2$ ), avant et après cuisson, dans les foies gras du groupe 'Fonte faible' (p 110).
- Figure 32** Spectre moyen prétraité de foie gras cru obtenu en FTIR (p 111).
- Figure 33** Exemples de spectres moyens obtenus en microspectroscopie FTIR (p 111).
- Figure 34** Spectres FTIR en dérivée seconde des bandes spectrales des amides I et II, de foies gras cru et cuit du groupe 'Fonte faible' (p 112).

- Figure 35** Analyse en composante principale réalisée à partir des données de la bande spectrale des amides I ( $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) des spectres FTIR de foies gras crus et cuits (p 112).
- Figure 36** Analyse en composante principale réalisée à partir des données de la bande spectrale des amides I et II ( $1475 - 1710 \text{ cm}^{-1}$ ) des spectres FTIR de foies gras crus (p 112).
- Figure 37** Reconstitution d'images spectrales à partir de l'acquisition en optique sur une coupe de foie gras cru du groupe 'Fonte faible', en fonction de l'intensité des différentes bandes spectrales : des amides I et II ( $1475 - 1710 \text{ cm}^{-1}$ ), des liaisons C=O des esters ( $1710 - 1780 \text{ cm}^{-1}$ ), des liaisons  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des chaînes aliphatiques ( $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ), et des liaisons C=C des chaînes aliphatiques insaturées ( $3000 - 3060 \text{ cm}^{-1}$ ) (p 112).
- Figure 38** Exemples de spectres moyens obtenus en UV en rayonnement synchrotron, exprimés en intensité de fluorescence (p 113).
- Figure 39** Analyse en composantes principales obtenues à partir des données spectrales UV du tryptophane (290-375 nm) des foies gras crus (p 113).
- Figure 40** Reconstitution d'images spectrales à partir d'une coupe de foie gras cuit du groupe 'Fonte faible', en fonction de l'intensité des différents composés : le tryptophane (290-375 nm) et le collagène (375-540 nm) (p 114).
- Figure 41** Synthèse des résultats - Proposition de mécanismes à l'origine de la variabilité de la fonte lipidique du foie gras de canard (p 133).

## *Liste des tableaux*

- Tableau 1** Composition et valeur nutritive du grain de maïs (Sauvant *et al.*, 2004) (p 32).
- Tableau 2** Répartition des prélèvements d'échantillons pour les analyses physico-chimiques, biochimiques, protéomiques et histologiques dans les deux volets du projet (p 62).
- Tableau 3** Programme d'isoélectrofocalisation utilisé pour la séparation des protéines de la fraction soluble à faible force ionique (p 70).
- Tableau 4** Composition biochimique et caractéristiques technologiques des foies gras constituant le volet 1 (p 87).
- Tableau 5** Composition biochimique et caractéristiques technologiques des groupes de foies gras comparés dans l'analyse protéomique du volet 1 (p 88).
- Tableau 6** Composition biochimique et caractéristiques technologiques des groupes de foies gras comparés dans l'analyse histologique du volet 1 (p 88).
- Tableau 7** Composition biochimique et caractéristiques technologiques des échantillons de protéomique, histologie et profils en lipides neutres et en triglycérides du volet 2 (p 88).
- Tableau 8** Paramètres zootechniques des animaux des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' (p 89).
- Tableau 9** Paramètres technologiques des animaux des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' (p 89).
- Tableau 10** Données physico-chimiques des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' (p 90).
- Tableau 11** Caractérisation biochimique des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' (p 90).
- Tableau 12** Mesure du statut oxydant des protéines et lipides des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' (p 91).

- Tableau 13** Mesure de la teneur en glycogène et en acide lactique des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' (p 91).
- Tableau 14** Profil en lipides neutres des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' (p 92).
- Tableau 15** Profil en triglycérides des échantillons du premier volet du projet (p 92).
- Tableau 16** Protéines identifiées dans la fraction protéique soluble à faible force ionique des foies gras, dont l'expression à 20 minutes *post mortem* varie en fonction de la fonte lipidique à la cuisson (p 94).
- Tableau 17** Protéines identifiées dans la fraction protéique soluble à faible force ionique des foies gras, dont l'expression évolue entre 20 minutes et 6 heures *post mortem* dans le groupe 'Fonte faible' (p 96).
- Tableau 18** Protéines identifiées dans la fraction protéique soluble à faible force ionique des foies gras, dont l'expression évolue entre 20 minutes et 6 heures *post mortem* dans le groupe 'Fonte élevée' (p 97).
- Tableau 19** Protéines identifiées uniquement dans la fraction non soluble à faible force ionique des foies gras du groupe 'Fonte faible' à 20 minutes *post mortem* (p 100).
- Tableau 20** Protéines identifiées uniquement dans la fraction non soluble à faible force ionique des foies gras du groupe 'Fonte élevée' à 20 minutes *post mortem* (p 100).
- Tableau 21** Résultats des Dot-Blots des protéines ribosomales L10 et S17 et du Western-Blot de la protéine MIMP, des échantillons de foies gras prélevés à 20 minutes *post mortem* (p 125).
- Tableau 22** Protéines en augmentation au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte faible', détectées dans la fraction protéique non soluble à faible force ionique (p 102).
- Tableau 23** Protéines en diminution au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte faible', détectées dans la fraction protéique non soluble à faible force ionique (p 102).
- Tableau 24** Protéines en augmentation au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte élevée', détectées dans la fraction protéique non soluble à faible force ionique (p 102).

- Tableau 25** Protéines en diminution au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte élevée', détectées dans la fraction protéique non soluble à faible force ionique (p 102).
- Tableau 26** Résultats de l'analyse d'images à partir des acquisitions en microscopie optique des colorations réalisées sur coupes à congélation de foies gras prélevés à l'éviscération (20 minutes *post mortem*), avant cuisson (à 6 heures *post mortem*, après réfrigération), et après cuisson (p 105).
- Tableau 27** Taux de matrice des acquisitions réalisées à partir des coupes à congélation des échantillons prélevés avant et après cuisson, des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée'. Les acquisitions ont été réalisées après coloration des structures non lipidiques au Bleu de Toluidine (acquisitions en fond clair), et après coloration des lipides de réserve au Rouge de Nile (acquisitions en fluorescence selon les filtres CY3 et FITC) (p 108).
- Tableau 28** Dénombrement et caractéristiques morphologiques des gouttelettes lipidiques du foie gras avant cuisson, selon 5 classes d'aire (p 109).
- Tableau 29** Dénombrement et caractéristiques morphologiques des gouttelettes lipidiques du foie gras après cuisson, selon 6 classes d'aire (p 110).



## RESUME

Les objectifs de ce travail sont d'identifier les mécanismes biologiques impliqués dans le déterminisme de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard, et de définir des marqueurs de la fonte. Pour répondre à ces objectifs, nous avons choisi de conduire une caractérisation du tissu hépatique, selon son comportement ultérieur à la cuisson, basée sur une approche intégrée combinant de la biochimie, de la protéomique et de l'histologie.

D'une part, l'expression différentielle des protéines hépatiques à l'abattage des animaux et au cours de la réfrigération, semble indiquer que le niveau de fonte pourrait être relié à des stades de développement de stéatose différents. Les animaux du groupe 'Fonte faible' se distinguent de ceux du groupe 'Fonte élevée' par un 'profil d'accrétion' avec la surexpression de protéines du métabolisme énergétique par exemple, indiquant des mécanismes de synthèse et d'accumulation de lipides. A l'inverse, les animaux du groupe 'Fonte élevée' présentent la surexpression de protéines de réponse au stress, ce qui pourrait indiquer un stade de stéatose plus avancé. Au cours de la réfrigération, la diminution globale de l'expression des protéines semble plus marquée dans le groupe 'Fonte faible'. Dans le groupe 'Fonte élevée', la surexpression de protéines du cytosquelette après réfrigération suggère un niveau de protéolyse plus important.

D'autre part, les observations histologiques montrent des modifications de la morphologie des gouttelettes lipidiques dans le foie gras cru et au cours de la cuisson. Il semble que la fonte soit d'autant plus importante quand des fusions de gouttelettes lipidiques surviennent dans le produit cru. De plus, lors de la cuisson, les observations sur foies gras du groupe 'Fonte élevée' révèlent une densification de la matrice non lipidique plus importante. Ces changements morphologiques et structuraux pourraient correspondre à un tissu plus fragile et donc plus sensible à la fonte lipidique.

L'ensemble des résultats acquis dans ce projet permet de formuler une hypothèse sur le déterminisme biologique de la fonte lipidique même si certains mécanismes identifiés restent à confirmer. De plus, la relation entre l'aptitude à la stéatose et la qualité technologique du foie gras est une piste à explorer afin de mieux comprendre la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson observée lors de la cuisson du foie gras de canard.

**MOTS-CLES :** Foie gras, Fonte lipidique, Protéomique, Histologie, Biochimie, Canard mulard, Cuisson, Qualité technologique.

## ABSTRACT

This work aims to identify the biological mechanisms involved in the determinism of variability of fat loss during cooking of duck 'foie gras'. To achieve this objective, we carried out a characterization of liver tissue, according to its later behaviour during cooking, and based on an integrated approach combining biochemistry, proteomic and histology.

On the one hand, the differential expressions of proteins early *post mortem* and during chilling indicate a different state of steatosis between the low and high fat loss groups. Livers with low fat loss during cooking were still in anabolic processes with regards to energy metabolism and protein synthesis, whereas livers with high fat loss during cooking developed cell protection mechanisms. The overall expression of proteins in the low ionic strength fraction was lower after chilling which revealed a down regulating effect of chilling on biological processes. In the high ionic strength fraction, the results showed an over expression after chilling of proteins from cytoskeleton and their associated proteins. This suggests that the variability of technological yield observed in processing plants could be explained by different state of ageing of fatty livers during chilling, most likely associated to different proteolytic pattern.

On the other hand, the histological observations showed that, in raw livers, the lipid droplets were nearly spherical while after cooking, they were larger and lost their spherical shape. We also observed a decrease in the number of droplets after cooking, probably due to droplet fusion caused by the heat treatment. Fat loss during cooking was higher when there was more fusion of lipid droplets before cooking. Furthermore, it seemed that the effect of cooking on liver tissue was different between the two fat loss groups. These morphological modifications could mark a fragility of the tissue associated with a higher fat loss during cooking.

All the results acquired in this work allowed us to draw a hypothesis on the biological determinism of cooking losses eventhough some of the identified mechanisms still need to be confirmed. The relationship between the potential to develop steatosis and the technological quality of 'foie gras' deserves further studies in order to better understand the variability in fat loss during cooking observed in processing plants.

**KEY WORDS:** 'Foie gras', Fat loss, Proteomic, Histology, Biochemistry, Mule duck, Cooking, Technological quality.

# *INTRODUCTION*

Chez les palmipèdes à foie gras, en réponse à l'alimentation riche en glucides lors du gavage, la lipogenèse *de novo* est fortement stimulée. Un déséquilibre entre la synthèse et la sécrétion des lipides vers les tissus périphériques conduit à l'accumulation de ceux-ci dans le foie et au développement de la stéatose hépatique. Après 12 à 18 jours de gavage, le poids de foie est multiplié par 10 et le taux de lipides atteint plus de 50% du poids de foie, contre 5% environ dans le foie d'animaux maigres. Les triglycérides représentent la très grande majorité de ces lipides, environ 95%. Cependant, si le gavage n'est pas prolongé, l'état de stéatose n'induit aucune lésion pathologique (Blum *et al.*, 1990 ; Bénard et Labie, 1998). Le poids de foie et la composition hépatique retrouvent des valeurs équivalentes à celles enregistrées avant gavage (Babilé *et al.*, 1996, 1998 ; Bénard *et al.*, 1998 ; Locsmándi *et al.*, 2005).

Le foie gras est un produit traditionnel français, qui depuis 2006 fait partie du patrimoine culturel et gastronomique français (Loi n° 2006-11 du 5 janvier 2006 d'orientation agricole ajoutée à l'article L654-27-1 au code rural français). La production de foie gras est très développée en France, premier pays producteur avec 19 000 tonnes en 2010, représentant plus de 70% de la production mondiale (Comité Interprofessionnel du Foie Gras, 2011).

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1994, la législation française réglemente toutes les appellations des préparations à base de foie gras vendues en France. Seules trois appellations peuvent bénéficier du terme 'Foie Gras', elles ne doivent contenir que du foie gras et un assaisonnement. Il s'agit du 'foie gras entier', du 'foie gras' et du bloc de 'foie gras'. Parmi ces dénominations, le 'foie gras entier' est le produit qui a la plus forte valeur ajoutée, environ le double du 'foie gras', composé de lobes agglomérés.

La forte teneur en lipides du foie gras en fait un aliment fortement déséquilibré sur le plan nutritionnel, mais lui confère les qualités organoleptiques qui lui assurent sa forte valorisation. Il est donc essentiel que les lipides soient retenus au cours de la cuisson. Cette capacité constitue la principale qualité du foie gras, et correspond au rendement technologique qui est un indicateur de la fonte lipidique à la cuisson. La fonte lipidique à la cuisson est réglementée : elle ne doit pas excéder 30% du produit fini (décret n° 93-999 du 9 août 1993, relatif aux préparations à base de foie gras). De plus, dans un contexte d'industrialisation de la production et une évolution du mode de commercialisation vers les grandes et moyennes surfaces, l'homogénéité du produit fini prend de l'importance et peut influencer la décision d'achat par le consommateur. En effet, la quantité de graisse exsudée est visible et contribue à la décision d'achat.

De nombreuses recherches ont été conduites sur l'identification de facteurs influençant la fonte lipidique à la cuisson. Jusqu'à aujourd'hui, les études se sont concentrées sur les facteurs zootechniques et technologiques qui sont désormais partiellement maîtrisés par les acteurs de la filière de production de foie gras. Malgré l'avancée de ces connaissances, il demeure une importante variabilité individuelle dans l'aptitude à la transformation du foie gras de canard. A ce jour, seule une diminution des poids de foies transformés permet de réduire la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson, sans que cela ne permette de contrôler la qualité du produit fini.

En effet, chez l'oie et le canard, il existe une corrélation positive entre le poids de foie et le taux de fonte lipidique à la cuisson (Nir et Nitsan, 1976 ; Barraud et Salladarre, 1980 ; Babilé, 1989 ; Blum *et al.*, 1990 ; Rousselot-Pailley *et al.*, 1993 ; Roussely *et al.*, 1993). De la même façon, le taux de lipides est corrélé avec la fonte à la cuisson (Rousselot-Pailley *et al.*, 1992), sur une large gamme de poids de foie. Il semble que plus l'engraissement du foie est important, plus celui-ci est susceptible de fondre à la cuisson. Néanmoins, à poids de foie équivalent, une grande variabilité est observée dans la réponse au traitement thermique.

Les lipides représentent le principal constituant biochimique du foie gras. C'est la raison pour laquelle de nombreuses études ont tâché de relier ceux-ci avec la fonte lipidique à la cuisson. Dans un premier temps, l'approche de la composition en lipides neutres et en acides gras des lipides de stockage des foies (Blum *et al.*, 1992 ; Baudonnet, 1993 ; Leprettre, 1998 ; Hermier *et al.*, 1999a) n'a pas démontré de relation avec la fonte lipidique. D'autre part, une hypothèse soulevée par certains auteurs portait sur une fragilité des membranes des hépatocytes, favorisant la fonte lipidique à la cuisson. Pour vérifier cette hypothèse, la composition des lipides membranaires des hépatocytes a été étudiée, plus particulièrement le ratio cholestérol / phospholipides considéré comme un indicateur de fluidité membranaire. Un lien entre ce ratio et la qualité technologique du foie gras a bien été mis en évidence chez l'oie (Cazeils *et al.*, 1999a), mais n'a pas pu être démontré chez le canard. De façon à compléter ces différentes approches, nous proposons dans ce travail de nous intéresser à la caractérisation biochimique générale du foie gras, et au profil en triglycérides en particulier. En effet, les triglycérides représentent plus de 95 % des lipides de réserve. Aussi, une étude plus détaillée de ces molécules nous paraît pertinente dans la construction biologique de l'aptitude à la transformation des foies gras. En effet, l'agencement des acides gras au niveau des triglycérides, en modifiant leur point de fusion, est susceptible de jouer un rôle dans la fonte lipidique à la cuisson.

Dans ce contexte, le présent projet a été développé autour du déterminisme biologique de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard. Pour cela, une approche intégrée a été développée, combinant des méthodes d'étude des principaux constituants du foie gras ainsi que des observations tissulaires.

L'implication de la fraction protéique dans les mécanismes de la fonte lipidique à la cuisson est très peu documentée. Les seules informations dont nous disposons concernent la teneur en protéines du foie gras, et son évolution au cours du gavage. Dans ce travail, nous proposons d'étudier la relation entre le profil d'expression des protéines et la fonte lipidique à la cuisson. En parallèle, l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique a fait l'objet d'études s'intéressant au déterminisme de l'aptitude à la stéatose hépatique. Aussi, nous avons développé des méthodes permettant de compléter ces connaissances en vérifiant les hypothèses émises sur le rôle des protéines membranaires et/ou des enzymes dans le déterminisme de la fonte lipidique à la cuisson. Pour cela, nous avons travaillé sur deux fractions protéiques distinctes, qui diffèrent selon leur propriété de solubilité. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression des protéines au moment de l'abattage des animaux, en considérant qu'il s'agissait du reflet du protéome le plus proche de celui de l'animal vivant. Ensuite, nous avons étudié l'évolution de l'expression des protéines au cours du refroidissement en relation avec la fonte lipidique à la cuisson.

Enfin, des observations histologiques montrent une variabilité de l'état d'engraissement hépatique (nombre et taille des gouttelettes lipidiques) exprimée en partie par le niveau d'engraissement, lui-même lié à la fonte lipidique (Bouiller-Oudot *et al.*, 2006). De plus, même si la capacité de la structure non lipidique à 'retenir' les lipides lors de la cuisson du foie gras a souvent été évoquée, aucune étude en ce sens n'a été publiée à ce jour. Aussi, dans le volet portant sur l'histologie, nous proposons de combiner différentes méthodes d'imageries nous permettant des observations à différents niveaux d'échelles pour caractériser la structure non lipidique, la morphologie des gouttelettes lipidiques et enfin les modifications de composition moléculaire.

Le projet sur lequel repose ce travail est constitué de deux volets. L'objectif du premier volet est d'identifier des mécanismes et de définir des marqueurs de la fonte lipidique à la cuisson par les différentes méthodologies présentées. L'objectif du second volet est de valider ces marqueurs en conditions expérimentales. Les résultats de ce travail seront présentés selon cet ordre en comparant les niveaux de fonte faible et élevée.

*ETUDE*

*BIBLIOGRAPHIQUE*

Chez les oiseaux, le foie joue un rôle majeur dans la production et le stockage d'énergie. D'une part, le foie est le site majeur de la lipogenèse endogène (Evans *et al.*, 1972 ; Leveille *et al.*, 1975 ; Saadoun et Leclercq, 1983 et 1987). En effet, chez les oiseaux, contrairement à la plupart des mammifères, les capacités de synthèse *de novo* des lipides sont très limitées dans les tissus périphériques tel que le tissu adipeux (Leveille *et al.*, 1975). D'autre part, chez les oiseaux, les hépatocytes constituent un lieu de stockage des lipides de réserve ; alors que chez les mammifères, les lipides de réserve sont essentiellement stockés dans les adipocytes.

Chez les palmipèdes à foie gras, le site majeur des réactions du métabolisme énergétique en réponse au gavage est le foie. Pendant cette phase, l'alimentation apportée en grande quantité sous forme de maïs stimule la lipogenèse *de novo*. Un déséquilibre entre la synthèse et la sécrétion de lipides conduit à l'accumulation de ceux-ci dans le foie. Il s'agit de la stéatose hépatique induite par le gavage, permettant la production de foie gras.

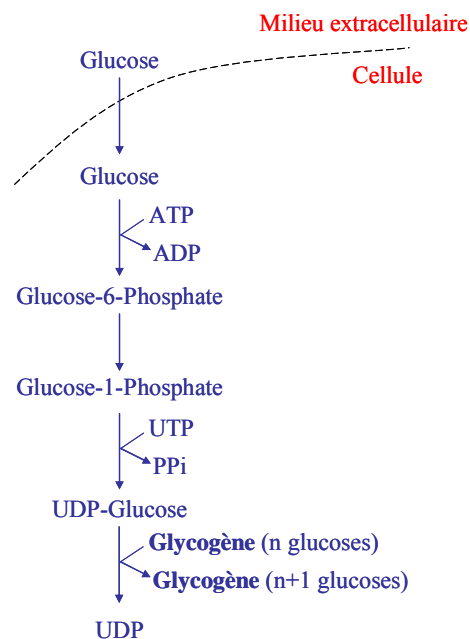
Dans cette étude bibliographique, nous présenterons dans un premier temps, les voies du métabolisme énergétique hépatique chez les oiseaux. Puis, nous aborderons le cas particulier de la stéatose hépatique des palmipèdes à foie gras. Dans cette partie, nous déclinons les caractéristiques de développement de la stéatose, les modifications hépatiques associées, et pour finir les facteurs de variation de l'aptitude à la stéatose. La troisième partie de cette étude portera sur la fonte lipidique à la cuisson évaluée par le rendement technologique. Ce dernier constitue la principale qualité technologique du foie gras. Dans ce dernier chapitre, après avoir abordé la question de l'implication de la fonte au niveau réglementaire et au niveau de la filière de production, nous présenterons les méthodes qui permettent son évaluation. Enfin, nous tâcherons de faire un état de l'art des facteurs de variation connus de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras.



**Tableau 1** : Composition et valeur nutritive du grain de maïs (Sauvant *et al.*, 2004).

Toutes les valeurs sont exprimées en pourcentages par rapport au produit brut.

Composition élémentaire, en pourcentage du produit brut		Acides gras, en pourcentage des acides gras totaux	
Matière sèche	86,4	Acide myristique C14:0	0,1
Protéines brutes	8,1	Acide palmitique C16:0	11,1
Cellulose brute	2,2	Acide palmitoléique C16:1	0,4
Matières grasses brutes	3,7	Acide stéarique C18:0	1,8
Cendres brutes	1,2	Acide oléique C18:1	26,9
Parois végétales	9,1	Acide linoléique C18:2	56,5
Amidon	64,1	Acide linoléique C18:3	1
Sucres totaux	1,6		
Energie brute (kcal/kg)	3860		



**Figure 1** : Synthèse du glycogène dans le foie par la voie de la glycogénogenèse

# 1. Le métabolisme hépatique des oiseaux

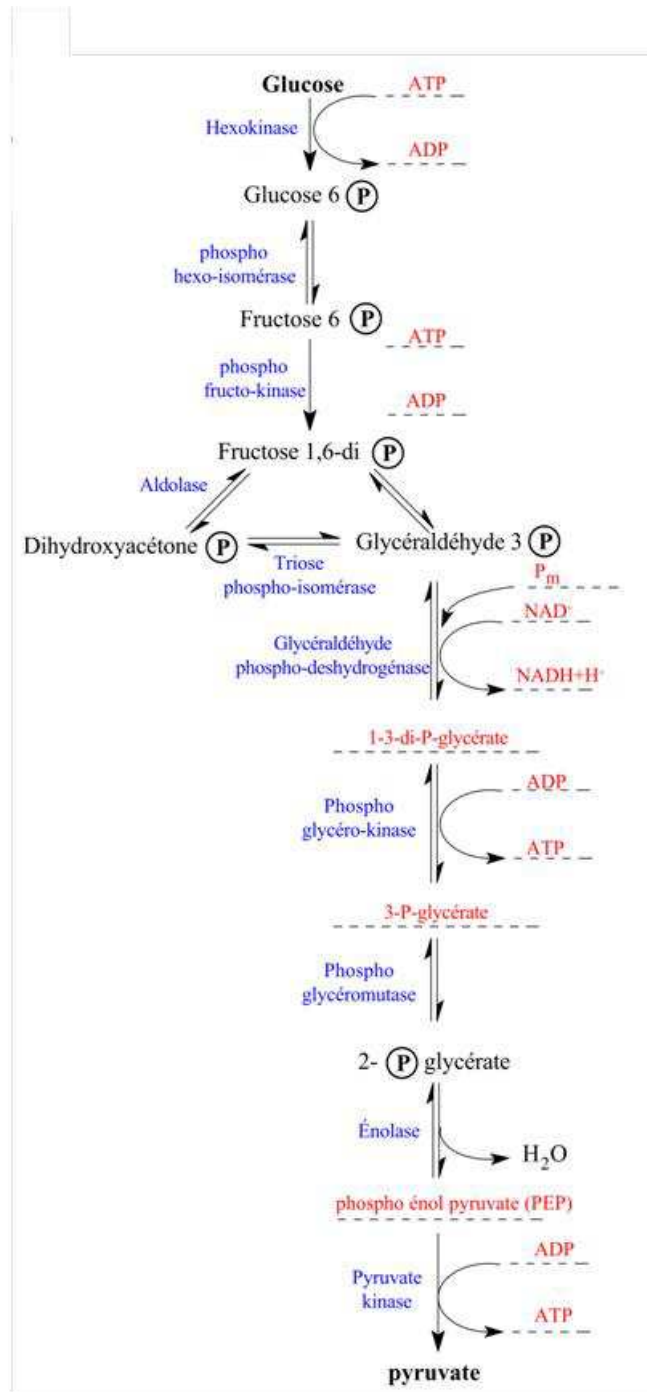
Chez les oiseaux comme chez les mammifères, les lipides jouent un rôle essentiel en tant que réserve énergétique. La couverture des besoins de l'organisme en lipides dépend (i) de l'utilisation des lipides alimentaires, (ii) de la lipogenèse hépatique à partir des résidus acétates provenant du catabolisme glucidique puis (iii) de la capacité d'exportation des lipides sous forme de lipoprotéines vers les tissus périphériques.

## 1.1. L'utilisation des lipides alimentaires

Bien que les lipides représentent une faible part des formules des aliments tant en élevage qu'en gavage, ils participent à la fourniture d'énergie pour les animaux. La forme majoritaire des lipides alimentaires correspond aux triglycérides, qui ne sont pas absorbables en tant que tels. L'utilisation des triglycérides repose donc sur leur hydrolyse par les lipases gastriques et pancréatiques, en mono- et diglycérides, acides gras et glycérol. Les monoglycérides et acides gras libres vont alors s'associer avec le cholestérol et les sels biliaires pour former des micelles. Ces micelles seront alors absorbées par les entérocytes de façon passive ou grâce à l'action de la 'fatty acid binding protein' (FABP) (Besnard *et al.*, 1997). Une fois dans la muqueuse intestinale, les acides gras à longue chaîne (supérieure à 12 atomes de carbone) sont en partie ré-estérifiés en triglycérides. Après s'être associés à des molécules de phospholipides, de cholestérol, d'esters de cholestérol et d'apolipoprotéines, ces triglycérides seront sécrétés des entérocytes sous forme de portomicrons. Ces derniers, équivalents des chylomicrons des mammifères (Griffin *et al.*, 1982), sont des lipoprotéines riches en triglycérides, qui circulent par la veine porte jusqu'au foie (Bensadoun et Rothfield, 1972). En effet, le système lymphatique des oiseaux est moins développé que celui des mammifères. Les acides gras à courte chaîne (inférieure à 12 atomes de carbone) sont quant à eux directement sécrétés dans le système porte hépatique et associés à l'albumine sérique pour être transportés jusqu'au foie (Hocquette et Bauchart, 1999).

## 1.2. Le métabolisme glucidique

L'alimentation des palmipèdes, et notamment des canards, est principalement composée de maïs, que ce soit dans les phases d'élevage ou de gavage. Le maïs est en



**Figure 2** : Réactions enzymatiques de la voie de la glycolyse

[http://www.lpasteur.org/IMG/pdf/td\\_glyco.pdf](http://www.lpasteur.org/IMG/pdf/td_glyco.pdf)

Légendes : NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide, ADP : Adénosine diphosphate, ATP : Adénosine triphosphate.

majorité constitué d'amidon (environ 60%), un glucide complexe de réserve ; sa composition élémentaire est décrite dans le tableau 1. L'amidon provenant de l'alimentation est hydrolysé par les amylases pancréatiques en dextrines puis en maltose. Ce dernier est à son tour hydrolysé par les enzymes intestinales (maltase et isomaltase) en glucose qui rejoint le foie grâce au système porte.

En fonction des besoins énergétiques, le glucose parvenu au foie peut être soit stocké sous forme de glycogène grâce à la voie de la glycogénogenèse, soit utilisé pour la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la glycolyse et au cycle de Krebs.

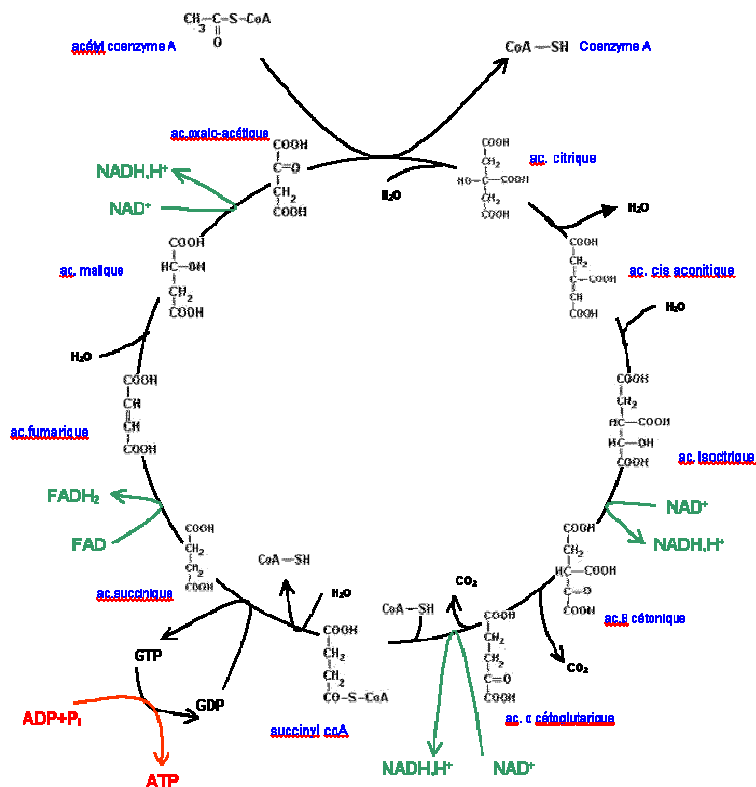
### *1.2.1. Stockage sous forme de glycogène*

Le glycogène est un glucide complexe, polymère du glucose, dont le rôle est de maintenir la glycémie entre les repas. Sa synthèse, par la voie de la glycogénogenèse (Figure 1), permet de stocker le glucose qui n'est pas utilisé immédiatement pour produire de l'énergie. La glycogénogenèse a lieu principalement dans le foie. La première étape de cette voie est la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate par la glucokinase. Celui-ci va devenir du glucose-1-phosphate sous l'action de la glucomutase, qui sera converti en UDP-glucose grâce à l'UDP-glucose pyrophosphorylase. L'UDP-glucose est une molécule riche en énergie qui pourra alors être transférée au glycogène par l'action de la glycogène synthétase, permettant ainsi son allongement.

La principale hormone contrôlant la glycogénogenèse est le glucagon. La sécrétion de ce dernier entraîne une augmentation de la concentration en AMPc, ce qui active une cascade de phosphorylations jusqu'à celle de la glycogène synthétase. Une fois cette dernière phosphorylée, son action, et donc l'allongement du glycogène, est inhibée.

### *1.2.2. Utilisation du glucose*

La production d'énergie à partir du glucose est réalisée grâce à la voie de la glycolyse et au cycle de Krebs. La glycolyse est cytoplasmique, et consiste en une succession de réactions enzymatiques (Figure 2). A partir d'une molécule de glucose, elle fournit deux molécules de pyruvate et deux d'ATP. Le pyruvate est alors capté par les mitochondries pour y être transformé en acétyl-CoA par l'action de la pyruvate déshydrogénase.



**Figure 3** : Réactions enzymatiques du cycle de Krebs

Légendes : ac. : acide, NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide, ADP : Adénosine diphosphate, ATP : Adénosine triphosphate, CoA : Coenzyme A.

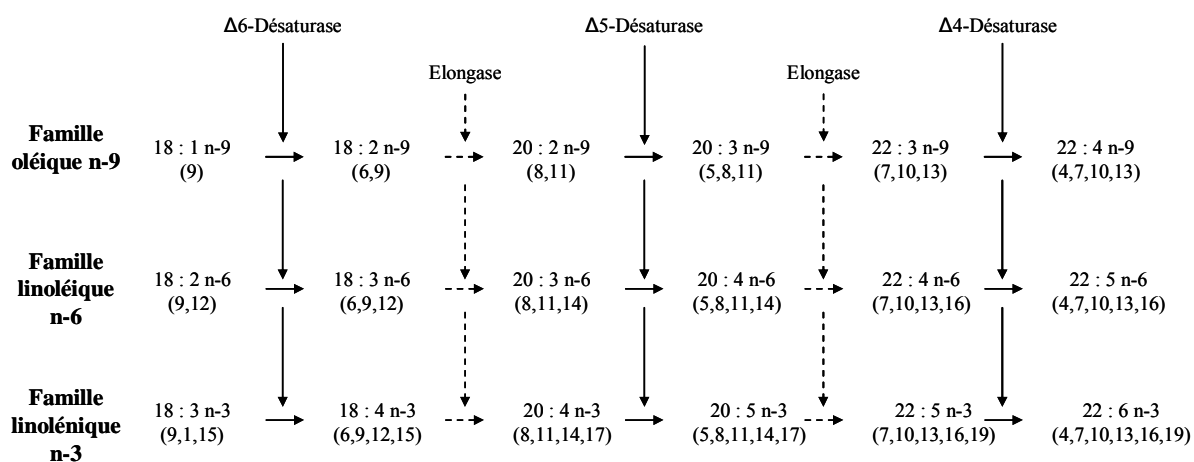
L'acétyl-CoA peut alors entrer dans le cycle de Krebs (Figure 3) où une cascade de réactions enzymatiques conduit à la formation d'intermédiaires énergétiques qui serviront à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire. L'acétyl-CoA peut également servir de substrat de base à la lipogenèse *de novo* pour la synthèse d'acides gras et de lipides. Ainsi, 75% du glucose entrent dans la synthèse *de novo* des lipides, comme démontré par Evans (1972) sur des explants cellulaires hépatiques de canards. Cette étude montre bien l'importance de la lipogenèse *de novo* dans le métabolisme hépatique des palmipèdes.

### 1.3. La lipogenèse *de novo*

Chez les oiseaux, contrairement à la plupart des mammifères, les capacités de synthèse *de novo* des lipides sont très limitées dans les tissus périphériques tel que le tissu adipeux (Leveille *et al.*, 1975). Le foie est en effet le site majeur de la lipogenèse endogène (Evans *et al.*, 1972 ; Leveille *et al.*, 1975 ; Saadoun et Leclercq, 1983 et 1987).

La synthèse des acides gras repose sur la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'action de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) en présence d'ATP. Ensuite, à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA, la 'Synthétase d'acides gras' (FAS pour 'Fatty Acid Synthase') catalyse la formation de chaînes carbonées saturées comportant 16 atomes de carbone, l'acide palmitique (Mayes, 1996). L'acide palmitique est donc le premier acide gras formé par la lipogenèse *de novo*.

La régulation de la lipogenèse *de novo* répond aux besoins de l'organisme selon les périodes d'alimentation ou de jeûne. Elle est hormonale, et dépend du rapport insuline / glucagon (Goodridge, 1987) : l'insuline, par l'activation de l'ACC, stimule la lipogenèse, alors que le glucagon l'inhibe. De plus, l'activité de l'ACC est essentielle dans la régulation de la synthèse de lipides. Son activité est identique chez des canards nourris *ad libitum*, que ce soient des canards Pékin ou de Barbarie. Mais elle augmente au cours du gavage et cette augmentation est d'autant plus importante chez les canards de Barbarie (Baéza *et al.*, 2005 ; Chartrin *et al.*, 2006) qui présentent une plus grande aptitude à la stéatose que le canard Pékin. Ceci semble indiquer une activité lipogénique plus intense chez le canard de Barbarie en réponse au gavage. De la même façon, l'activité de l'enzyme FAS est plus intense chez les



**Figure 4** : Synthèse des acides gras polyinsaturés à chaîne longue (d'après Numa, 1984)

Les chiffres entre parenthèses indiquent les positions des doubles liaisons par rapport au carbone carboxylique (1). La nomenclature n-9, n-6 et n-3 indique la position de la double liaison la plus proche du carbone méthylique (n<sup>ème</sup> carbone) par rapport à celui-ci).

canards de Barbarie que chez le canard Pékin en élevage *ad libitum* ou en gavage (Baéza *et al.*, 2005).

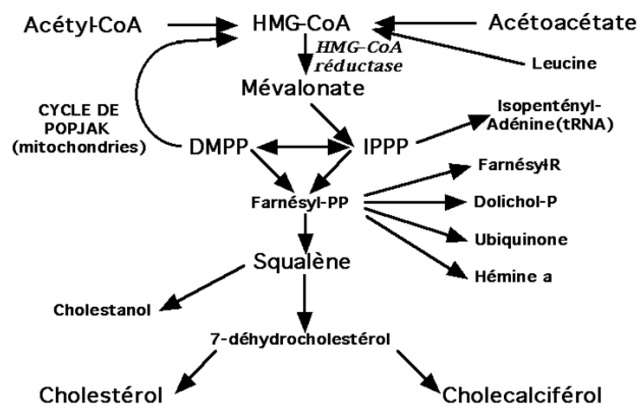
Ensuite, à partir de l'acide palmitique, formé par la lipogenèse *de novo*, ou les acides gras essentiels fournis par l'alimentation (acides linoléique et linoléique), les autres acides gras à longue chaîne sont synthétisés grâce à l'action d'élongases et de désaturases du réticulum endoplasmique (Figure 4).

Selon le site de désaturation, on distingue quatre types d'enzymes : les  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ - et  $\Delta 4$ - désaturases. Dans un premier temps, la  $\Delta 9$ -désaturase agit sur les acides gras à longue chaîne (acides palmitique et stéarique) où elle produit une désaturation entre les carbones 9 et 10 à partir de l'extrémité carboxylique. Les autres désaturases interviennent ultérieurement, et sont associées aux élongases pour introduire des insaturations du côté de l'extrémité carboxylique. Les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique sont des acides gras essentiels, c'est-à-dire que l'organisme ne peut les synthétiser et ils doivent donc être apportés par l'alimentation. Mais, à partir de ces acides gras, d'autres peuvent être synthétisés par l'action de désaturases et élongases. Ainsi, à partir de l'acide linoléique, l'organisme peut synthétiser de l'acide arachidonique qui est un constituant majeur des phospholipides membranaires.

De même, les acides gras à plus longue chaîne saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI) seront produits et pourront alors être estérifiés sous forme de triglycérides, de phospholipides et d'esters de cholestérol.

Dans les organismes vivants, la majeure partie des lipides est constituée de triglycérides. Ainsi, dans les cas de stéatose hépatique des palmipèdes induite par le gavage, plus de 95% des lipides hépatiques sont des triglycérides. Leur synthèse dans les hépatocytes a lieu dans le réticulum endoplasmique. Tout d'abord, le glycérol est phosphorylé en glycérol-3-phosphate, grâce à l'action de la glycérol-kinase avec consommation d'ATP. Le produit de cette réaction va servir de substrat pour deux acylations successives par l'action de la glycérol phosphate acyltransférase qui va fixer deux acides gras à longue chaîne en positions 1 et 2 par estérification. Le résultat est la formation de l'acide phosphatidique. L'action de la phosphatidate phosphatase permet l'hydrolyse de ce dernier en 1,2-diglycérides. Une réaction d'acylation en position 3 permet la fixation d'un troisième acide gras, et donc la formation d'un triglycéride.





**Figure 5** : Voie de synthèse du cholestérol

HMG-CoA : hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA, IPPP : isopentényl pyrophosphate, DMPP : diméthylallyl pyrophosphate.

Les phospholipides majeurs des structures cellulaires sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE). La synthèse des phospholipides repose sur la même voie enzymatique jusqu'à l'intermédiaire acide phosphatidique ou 1,2-diglycéride. Le transfert sur le 1,2-diglycéride d'un groupement phosphoryl choline ou phosphoryl éthanolamine grâce à l'action d'une transférase, permet la formation de PC et PE respectivement. Les intermédiaires sont issus de la fixation de choline ou d'éthanolamine avec un groupement cytidine diphosphate. Dans le foie, une autre voie conduit à la conversion de PE en PC par méthylation progressive sur l'azote du résidu éthanolamine par la PE méthyl transférase avec la S-adénosyl méthionine comme donneur de groupement méthyl (Jiménez-Lopéz *et al.*, 2003). La phosphatidylsérine (PS) est synthétisée à partir de la PE par échange de l'éthanolamine avec la sérine. La PS peut conduire à la formation de PE par décarboxylation.

Le cholestérol est un constituant majeur des membranes cellulaires, mais également des protéines plasmatiques sous forme de cholestérol libre ou estérifié. C'est un précurseur de nombreuses molécules telles que la vitamine D3, les hormones stéroïdes et les sels biliaires. Le cholestérol peut avoir une origine alimentaire, ou être synthétisé par l'organisme dans le cytoplasme des cellules principalement du foie et de l'intestin. La synthèse du cholestérol comporte de nombreuses étapes qui ont pour substrat initial l'acétyl-CoA (Figure 5), elle se fait à partir de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). L'HMG-CoA provient de la condensation de trois Acétyl-CoA. Les acides gras à courte chaîne et la leucine peuvent également servir de substrat à la synthèse du cholestérol. La première étape est la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate par l'HMG-CoA réductase. Les radicaux isoprènes actifs, isopentényl pyrophosphate (IPPP) et diméthylallyl pyrophosphate (DMPP) sont produits à partir du mévalonate. Les étapes intermédiaires de la voie, jusqu'au farnéssyl pyrophosphate conduisent aux synthèses des radicaux isopentényl et farnéssyl et des isoprénoïdes. A partir du squalène, débutent les synthèses des stérols, dont le cholestérol.

#### 1.4. L'exportation des lipides

Les lipides d'origine alimentaire et issus de la lipogenèse *de novo* sont exportés du foie vers les tissus périphériques grâce à des lipoprotéines. Ils pourront alors être utilisés pour la production d'énergie, soit en étant totalement dégradés sous forme de CO<sub>2</sub> via la β-oxydation, soit en étant partiellement dégradés en corps cétoniques via la cétogenèse.

Sur la base de leur densité après ultracentrifugation, les lipoprotéines peuvent être classées en différentes catégories (Hermier *et al.*, 1988) :

- les portomicrons sont sécrétés par les entérocytes. Les portomicrons assurent le transport des acides gras à longue chaîne (supérieure à 12 atomes de carbone) et du glycérol libre des entérocytes vers les tissus périphériques, par le système porte.

- les lipoprotéines de très faible densité (VLDL pour 'Very Low Density Lipoprotein') sont sécrétées par le foie, et sont très riches en triglycérides et pauvres en cholestérol. Les VLDL ont pour rôle de transporter les acides gras du foie vers les tissus périphériques, qui pourront être utilisés pour la production d'énergie ou le stockage de composés énergétiques.

- les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL pour 'Intermediate Density Lipoprotein') sont issues de la dégradation des VLDL dépourvue de l'apolipoprotéine C. Les IDL sont des transporteurs de cholestérol.

- les lipoprotéines de faible densité (LDL pour 'Low Density Lipoprotein') sont sécrétées par le foie, et sont des transporteurs de cholestérol.

- les lipoprotéines de densité élevée (HDL pour 'High Density Lipoprotein') sont sécrétées par le foie, et sont riches en cholestérol et en protéines mais pauvres en triglycérides. Les HDL ont également pour fonction le transport du cholestérol du foie vers les tissus périphériques, en plus de son re-captage vers le foie.

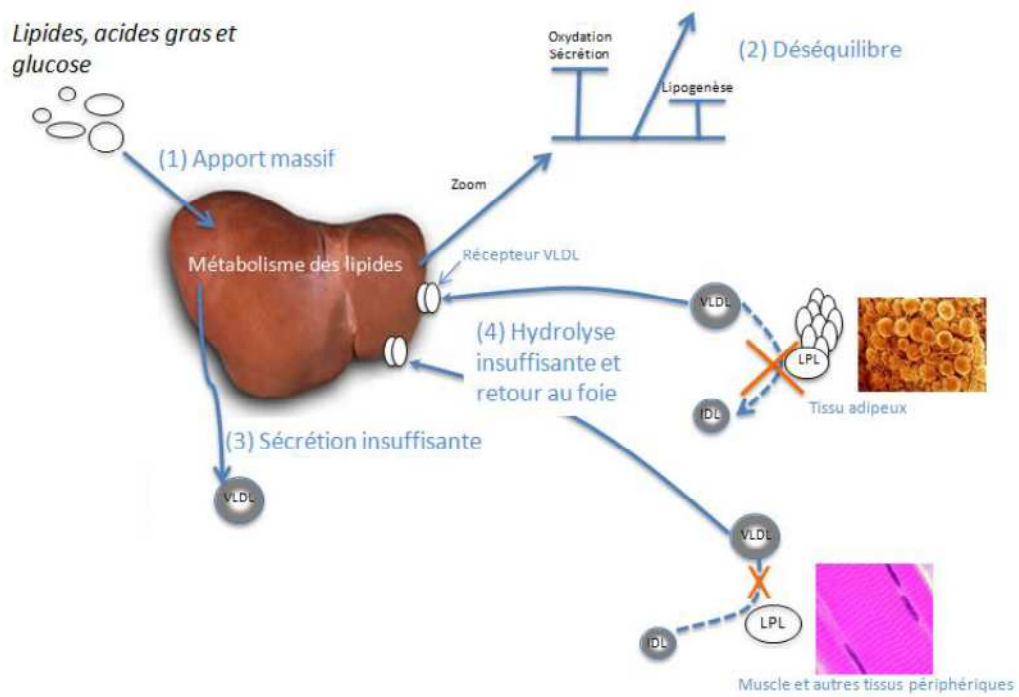
Les triglycérides pris en charge par les VLDL ne peuvent franchir les membranes des cellules sans être hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) en glycérol et acides gras libres (Butterwith, 1988 ; Bensadoun, 1991 ; Cooper *et al.*, 1992). Ce sont les produits de cette hydrolyse qui pourront être assimilés par les tissus périphériques. La LPL est principalement synthétisée par les tissus adipeux et musculaire, mais elle se trouve fixée sur l'endothélium des capillaires sanguins. L'activité post-prandiale de la LPL dans le tissu adipeux est très élevée, ce qui permet l'incorporation des triglycérides. Inversement, son activité durant un jeûne chute dans le tissu adipeux, mais reste élevée dans le tissu musculaire (Davail *et al.*, 2000).

## 2. La stéatose hépatique des palmipèdes

Chez l'homme, la stéatose hépatique correspond à un état pathologique associé à un dysfonctionnement des fonctions hépatiques. Elle peut résulter d'une consommation excessive d'alcool, d'une substance toxique, d'un syndrome métabolique comme l'obésité ou la résistance à l'insuline, ou encore survenir après une chirurgie. La stéatose hépatique non alcoolique est la forme la plus répandue dans les pays occidentaux, et est connue pour être précurseur de stéatohépatite qui peut se développer en cirrhose, voire en cancer primaire du foie (Torres et Harrison, 2008).

Chez les oiseaux, l'état de stéatose hépatique ne revêt pas toujours un caractère pathologique et il peut même survenir spontanément, sans alimentation forcée, dans certaines situations. Ainsi, chez la poule en ponte, une forte activité lipogénique et une augmentation du poids de foie et de la teneur en lipides hépatiques sont observées avant l'ovulation, sous influence œstrogénique. Ces lipides sont ensuite sécrétés et utilisés pour la vitellogenèse (Sauveur, 1988). L'aptitude particulière de certains palmipèdes à développer une stéatose hépatique est attribuée aux caractéristiques des palmipèdes sauvages chez qui la stéatose permettrait le stockage d'énergie avant les migrations. C'est donc cette capacité naturelle qui est exploitée pour la production de foies gras d'oie et de canard.

La stéatose alimentaire des palmipèdes induite par le gavage repose donc sur une aptitude naturelle à l'engraissement et elle est réversible (Babilé *et al.*, 1996, 1998 ; Bénard *et al.*, 1996 ; Locsmándi *et al.*, 2005). En effet, le gavage n'induit pas de lésions majeures au niveau histologique même si d'importants changements sont observés (Blum *et al.*, 1990 ; Bénard et Labie, 1998). De plus, les activités métaboliques sont conservées (Hermier *et al.*, 1998). Si le gavage des animaux est interrompu, le poids de foie diminue rapidement, traduisant l'exportation des lipides vers les tissus périphériques (Blum *et al.*, 1990 ; Bénard et Labie, 1998). A l'issue d'un gavage de deux semaines, les caractéristiques histologiques du foie et les paramètres physiologiques retournent progressivement aux valeurs enregistrées avant gavage, pour les atteindre quatre semaines après l'arrêt du gavage (Babilé *et al.*, 1996, 1998 ; Bénard *et al.*, 1998 ; Locsmándi *et al.*, 2005).



**Figure 6 :** Mécanismes de développement de la stéatose hépatique chez le canard (d'après Saez, 2009).

## 2.1. Mécanismes de la stéatose hépatique chez les palmipèdes

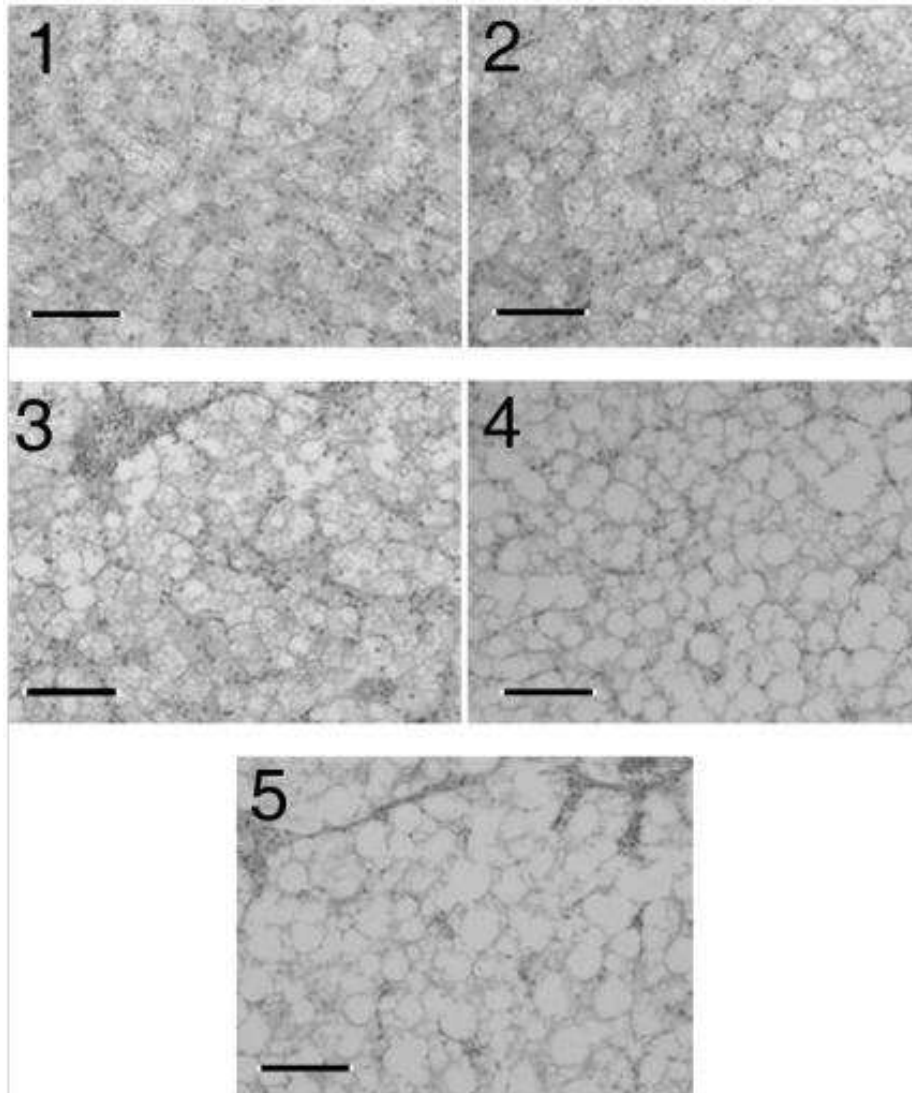
L'alimentation des animaux pendant le gavage induit un apport massif de glucides, et dans une moindre mesure de lipides (Figure 6-(1)). Au niveau du foie, la lipogenèse *de novo* est alors fortement stimulée et conduit à une accumulation de lipides lorsqu'il y a un déséquilibre métabolique en faveur de la synthèse des lipides par rapport à leur exportation notamment sous forme de VLDL ou leur oxydation (Figure 6-(2)). Bien que la quantité de lipoprotéines sécrétées (VLDL et HDL) augmente pendant le gavage (Fournier *et al.*, 1997), cela n'est pas suffisant pour inhiber les mécanismes de mise en place de la stéatose hépatique.

Plusieurs hypothèses ont été émises sur l'origine de la mise en place de la stéatose hépatique pendant le gavage (Saez, 2009). D'une part, il pourrait s'agir d'un défaut de sécrétion des lipides néo-synthétisés dû à une capacité limitée de synthèse d'ApoB et/ou de la protéine microsomale de transfert des triglycérides indispensables à la formation des VLDL (Figure 6-(3)). Il pourrait également s'agir d'un défaut d'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) au niveau périphérique avec pour conséquence un retour des lipides vers le foie (Figure 6-(4)).

Chez l'oie landaise, qui présente une importante aptitude à la stéatose hépatique, Hermier *et al.* (1991) ont démontré une utilisation préférentielle des phospholipides néosynthétisés pour la synthèse des membranes cellulaires aux dépens de leur utilisation pour l'assemblage des VLDL. Ce déséquilibre aurait pour conséquence de favoriser l'hypertrophie cellulaire plutôt que l'exportation des lipides sous forme de VLDL.

Après sécrétion des lipides du foie vers les tissus périphériques, les VLDL sont hydrolysées par la LPL pour permettre ainsi le stockage des lipides dans les tissus. L'activité de la LPL constitue donc un facteur limitant de l'utilisation des lipides néo-synthétisés : une faible activité conduirait à une utilisation par les tissus périphériques moins importante avec pour conséquence un retour des VLDL vers le foie, favorisant ainsi le développement de la stéatose hépatique et l'accroissement du poids de foie.

Enfin, au cours du gavage, les animaux ne sont jamais à jeun, mais en permanence sous l'effet d'une stimulation insulinique postprandiale. Hermier *et al.* (1999b) suggèrent que cet état physiologique inhiberait l'hydrolyse des triglycérides et favoriserait donc leur stockage au niveau hépatique.



**Figure 7** : Observations histologiques de foie d'oie au cours du gavage (0, 7, 11, 14 et 18 jours de gavage : photos 1 à 5 respectivement) réalisées à partir d'inclusions en paraffine et de coupes colorées à l'hématoxyline – éosine (Locsmándi *et al.*, 2007).

La barre d'échelle correspond à 100  $\mu\text{m}$ .

## 2.2. Modifications associées à la stéatose hépatique

Les modifications structurales, d'expression de gènes, et de compositions protéique et lipidique induites par la stéatose hépatique, bien que très importantes, ne détériorent pas les fonctions hépatiques (métabolismes glucidiques, lipidiques et protéiques, détoxification, stockage).

La mise en place de la stéatose hépatique dépend de nombreux facteurs. Néanmoins, certaines modifications structurales, biochimiques ou associées à l'expression de gènes sont observées de façon constante en réponse à l'apport massif de glucides dans l'alimentation des palmipèdes.

### *2.2.1. Modifications structurales associées à la stéatose hépatique*

La production de foies gras de palmipèdes résulte d'une augmentation pondérale du foie très importante. Le poids de foie peut être multiplié par 10 après gavage, pour représenter jusqu'à 10% du poids corporel total de l'animal.

La mise en place de la stéatose hépatique au cours du gavage des oies a été étudiée par tomographie, une méthode qui permet de reconstituer le volume du foie à partir d'une série de mesure 'par tranches' (Locsmándi *et al.*, 2005 et 2007). Les résultats indiquent que le gavage induit une modification de la densité du foie aux rayons X, en lien avec l'hypertrophie du foie correspondant à la surcharge des hépatocytes en lipides, principalement des triglycérides, sous forme de gouttelettes lipidiques.

Le développement de la stéatose hépatique induite par le gavage suit une évolution centripète : l'engraissement débute dans la région périportale pour s'étendre vers la région centrolobulaire (Labie et Tournut ; 1970). En fin de gavage, toutes les cellules présentent des inclusions lipidiques de plus ou moins grande taille.

Chez l'oie, des observations histologiques ont été réalisées selon une cinétique de gavage (Bénard et Labie, 1998 ; Locsmándi *et al.*, 2007) (Figure 7). A la mise en gavage, les hépatocytes sont de petite taille, sans inclusion lipidique et présentent un noyau en position centrale (Figure 7-(1)). Dès le début du gavage, la taille des cellules augmente, et les premières gouttelettes lipidiques sont observées. Rapidement, les gouttelettes lipidiques sont nombreuses et le noyau est à la périphérie de la cellule. Les hépatocytes situés en région périportale présentent un engraissement de type micro-vacuolaire sur environ 70-80% de la



cellule ; le reste du tissu montre un début d'engraissement de type micro-vacuolaire (Figure 7-(2)). Après la mi-gavage, l'engraissement tend vers un type macro-vacuolaire, c'est-à-dire que les hépatocytes contiennent des inclusions lipidiques de taille égale ou supérieure à 1/10 de la surface cellulaire (Figure 7-(3)). Cet état se confirme et se développe (Figure 7-(4)), jusqu'à ce que la très forte accumulation de lipides rende les observations au niveau de la cellule difficile par la suite (Figure 7-(5)). Cependant, Locsmándi *et al.*, (2007) n'ont observé aucune rupture membranaire, contrairement à Bénard et Labie (1998) qui notent la présence de quelques unes. Dans les deux cas, le tissu est inclus en paraffine, mais les colorations utilisées diffèrent et peuvent expliquer les différences observées en termes d'intégrité des membranes.

Dans tous les cas, la stéatose hépatique induite par le gavage des palmipèdes est réversible, un retour à des structures identiques à celles d'animaux non gavés est observé en histologie (Babilé *et al.*, 1996, 1998 ; Bénard *et al.*, 1996) et par tomographie (Locsmándi *et al.*, 2005).

Jusqu'à présent, les méthodes employées en histologie du foie gras (Blum et Leclercq, 1973 ; Bénard et Labie, 1998; Bouillier-Oudot *et al.*, 2006 et 2008; Locsmándi *et al.*, 2007) reposaient sur l'utilisation de solvants qui éluaien les lipides et ne permettaient donc pas leur observation au sein du tissu. Les résultats portaient essentiellement sur la caractérisation de la stéatose en micro ou macro-vacuolaire, selon la relation entre la taille des gouttelettes lipidiques et la taille des hépatocytes. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée à l'échelle des gouttelettes lipidiques, que ce soit en microscopie optique ou électronique.

### ***2.2.2. Modifications de la composition biochimique associées à la stéatose hépatique***

De nombreuses études ont porté sur la caractérisation biochimique du foie gras de palmipèdes. A notre connaissance, la plus exhaustive en termes de composés étudiés est celle réalisée par Baudonnet (1993). Il s'agit d'une cinétique de la composition biochimique du foie à différents stades de gavage (0, 3, 6, 9 et 12 jours), réalisée chez le canard de Barbarie. Dès le premier stade de gavage, le poids de foie augmente significativement et est multiplié par un facteur d'environ 2,5. En parallèle des mécanismes d'accrétion de constituants biochimiques, la teneur en eau évolue également au cours du gavage (Baudonnet, 1993). Dès les trois premiers jours de gavage, elle montre une très forte élévation, et explique majoritairement

l'augmentation pondérale du foie. La teneur en eau se stabilise dans les jours suivants, puis augmente faiblement en toute fin de gavage.

L'augmentation pondérale du foie correspond principalement à une accumulation de lipides, notamment des triglycérides. L'accroissement de la teneur en lipides traduit une activation intense de la lipogenèse dans le foie. Dans le cadre de cette même cinétique de gavage, l'évolution du profil en acides gras du foie a été étudiée. Les acides oléique, palmitique et palmitoléique sont les principaux acides gras montrant une augmentation dès les trois premiers jours de gavage ; cette augmentation se poursuit jusqu'à la fin du gavage pour ce qui est de la teneur en acide oléique. En revanche, une forte diminution relative des acides linoléique et linoléique (acides gras essentiels) ainsi que de l'acide stéarique est observée, du début à la fin du gavage. Cette évolution du profil en acides gras informe sur l'activité des enzymes responsables de la formation des acides gras. En effet, il semble que l'action des  $\Delta 9$  désaturases précède celle des élongases, ce qui favoriserait donc la synthèse des acides oléique et palmitoléique aux dépens de l'acide stéarique.

Enfin, les teneurs en phospholipides et cholestérol augmentent également tout au long du gavage (Leclercq et Blum, 1975 ; Baudonnet, 1993). Il s'agit de constituants des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques. Leur évolution signe donc également des mécanismes d'adaptation à l'accumulation de lipides au niveau hépatique, en termes d'hypertrophie cellulaire et transport des lipides synthétisés. Au cours du gavage, une accumulation d'acides gras néo-synthétisés, particulièrement de l'acide oléique, au niveau des phospholipides membranaires a été observé (Cazeils *et al.*, 1999b). Ces auteurs ont également observé une diminution du rapport des phospholipides et du cholestérol aux protéines et une augmentation du rapport du cholestérol aux phospholipides. Ces résultats suggèrent que l'accumulation d'acides gras insaturés préférentiellement pourrait induire une fluidification des membranes, compensée par l'accumulation de cholestérol.

La composition lipidique de la membrane des hépatocytes de foie gras de canard a été étudiée avant et après gavage (Molee *et al.*, 2005). Seuls les deux phospholipides majeurs des membranes plasmiques des hépatocytes montrent une évolution significative au cours du gavage : la proportion de phosphatidyléthanolamine augmente aux dépens des phosphatidylcholines.

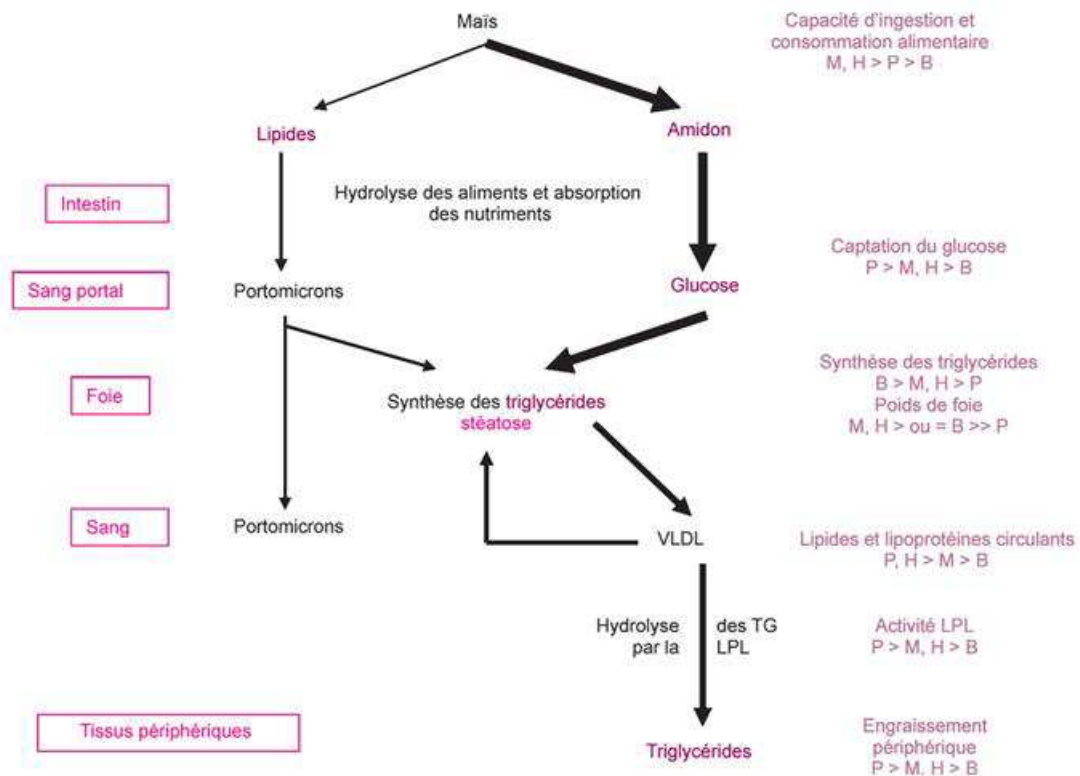
Dans une moindre proportion que les lipides, la teneur en protéines augmente elle aussi au cours du gavage mais sa proportion ramenée au poids de foie total diminue en faveur

des lipides (Baudonnet, 1993 ; Bax *et al.*, 2011). La synthèse de protéines dès les premiers jours de gavage répond au besoin d'adaptation de stockage massif des lipides dans les hépatocytes. De la même façon, Baudonnet (1993) et Leprettre (1998) observent une accumulation de composés glucidiques (glucose et glycogène) dans les premiers stades de gavage. Il semble que la réponse du foie en termes de dégradation des glucides massivement apportés par l'alimentation ne soit pas suffisante au tout début du gavage.

### *2.2.3. Modifications d'expression de gènes associées à la stéatose hépatique*

Récemment, plusieurs études ont porté sur l'évolution du profil d'expression génique au cours de la stéatose hépatique des palmipèdes induite par le gavage. Après gavage, les gènes impliqués dans la synthèse des triglycérides et des acides gras sont surexprimés, et ceux impliqués dans la  $\beta$ -oxydation sont sous exprimés, chez l'oie (Zhu *et al.*, 2011) et le canard (Hérault *et al.*, 2009). Les résultats portant sur les gènes impliqués dans la glycolyse sont contradictoires entre les deux études. En effet, chez le canard, ils indiquent une surexpression des gènes impliqués dans la glycolyse (Hérault *et al.*, 2009) et à l'inverse une sous expression chez l'oie landaise (Zhu *et al.*, 2011).

Les modifications d'expression de gènes en relation avec la stéatose hépatique alimentaire sont influencées par l'espèce animale. Ainsi, chez le canard de Pékin, les quantités d'ARNm du gène CPT1A (codant pour la carnitine palmitoyltransférase 1A, enzyme impliquée dans l'oxydation des acides gras) sont plus importantes que chez le canard de Barbarie ; ce qui suggère une part plus importante de l'oxydation des lipides au détriment de leur stockage dans le foie chez le premier (Hérault *et al.*, 2009). De plus, une surexpression du gène codant pour la protéine Apolipoprotéine B (protéine majoritaire des VLDL) a été identifiée chez les canards Pékin par rapport aux canard de Barbarie (Saez *et al.*, 2008a et b ; Hérault *et al.*, 2009), indiquant une plus importante exportation des lipides vers les tissus périphériques. La comparaison de l'oie des Landes avec l'oie blanche Sichuan a mis en évidence chez la première une surexpression de gènes impliqués dans l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, et dans la gluconéogenèse (Chunchun *et al.*, 2008 ; Pan *et al.*, 2010). A l'inverse, les mêmes auteurs ont trouvé, chez l'oie blanche Sichuan par rapport à l'oie des Landes, une surexpression de gènes impliqués dans la sécrétion des lipides. Ces



**Figure 8 :** Mécanismes de la stéatose chez les palmipèdes (Hermier *et al.*, 1999b) et aptitude à la stéatose hépatique en réponse au gavage des canards de Barbarie (B), Pékin (P), mulard (M) et hinny (H) (Baéza *et al.*, 2005).

résultats sont cohérents avec les différences d'aptitude à la stéatose entre les deux espèces d'oie en faveur de l'oie des Landes (Han *et al.*, 2008).

## 2.3. Facteurs génétiques de variation de l'aptitude à la stéatose hépatique

### *2.3.1. Les différences entre espèces et genres et leurs mécanismes*

Toutes les espèces de palmipèdes ne répondent pas de la même manière au gavage et n'ont pas la même capacité de production de foie gras.

Ainsi, chez les canards, l'aptitude à la stéatose hépatique est plus importante chez le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) et le canard mulard (*Cairina moschata* x *Anas platyrhynchos*) que chez le canard commun (*Anas platyrhynchos*) et le canard hinny – croisement inverse du canard mulard (Guy *et al.*, 1999 ; Davail *et al.*, 2003 ; Hermier *et al.*, 2003 ; Baéza *et al.*, 2005). Ces différences d'aptitude à la stéatose observées entre espèces de canards peuvent être mises en relation avec les mécanismes de développement de cette stéatose (Figure 8, Hermier *et al.*, 1999b ; Baéza *et al.*, 2005).

Chez les oies, l'aptitude à la stéatose est beaucoup plus importante chez l'oie landaise que chez l'oie polonaise, dont la capacité à produire du foie gras est très modérée (Fournier *et al.*, 1997 ; Hermier *et al.*, 1999 ; Davail *et al.*, 2000 ; Mourot *et al.*, 2000). De la même façon, l'oie landaise a une meilleure aptitude à la stéatose que l'oie chinoise Sichuan (Han *et al.*, 2008), qui s'explique par une expression différentielle de gènes impliqués dans l'accumulation des triglycérides en faveur des oies landaises et de gènes impliqués dans la sécrétion des lipides vers les tissus périphériques en faveur de l'oie Sichuan (Pan *et al.*, 2010). Enfin, l'oie landaise présente une aptitude à la stéatose supérieure à l'oie chinoise Xupu, qui se caractérise par un engraissement périphérique plus important et un accroissement du poids de foie plus faible pour cette dernière (Liu *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que ces différences sont principalement dues à une activité des enzymes de l'anabolisme lipidique plus importante chez l'oie landaise.

Les espèces les plus fréquemment élevées pour la production de foie gras sont donc le canard mulard, le canard de Barbarie et l'oie grise des Landes. Mais au sein même de ces espèces, il existe une grande variabilité individuelle dans la réponse au gavage, en termes de

poids de foie et de performances technologiques dont le déterminisme biologique reste inconnu.

Le transport des lipides du foie vers les tissus périphériques est réalisé via les lipoprotéines (VLDL et HDL).

Chez le canard, les concentrations en VLDL et lipides plasmatiques sont plus importantes chez le canard Pékin par rapport au canard de Barbarie, ce qui indique une capacité d'exportation plus importante et un stockage des lipides dans le foie limité (Hermier *et al.*, 2003). Ces différences d'aptitude à la stéatose sont confirmées par un état d'engraissement périphérique plus important chez le canard Pékin en fin de gavage, qui peut être expliqué par une lipogenèse intra-musculaire plus importante chez ces animaux (Saez *et al.*, 2009).

Chez l'oie, plusieurs études ont comparé la capacité d'exportation des lipides chez deux espèces : l'oie landaise qui présente une aptitude à la stéatose importante et est donc utilisée pour la production de foie gras, et l'oie polonaise qui présente une bien moindre capacité à la stéatose et qui est donc utilisée pour la production de viande. Tout d'abord, il a été montré que l'incorporation des triglycérides dans les VLDL est moindre chez l'oie landaise (Hermier *et al.*, 1991), ce qui a pour conséquence une exportation des lipides limitée et un stockage de ceux-ci dans le foie. Ensuite, le gavage des oies polonaises induit un niveau de VLDL et HDL plasmatiques plus important que celui des oies landaises (Salichon *et al.*, 1997 ; Fournier *et al.*, 1997), d'où une exportation des lipides vers les tissus périphériques plus intense et une moins bonne capacité de stockage des lipides dans le foie. Enfin, une étude réalisée sur du foie gras d'oie polonaise a montré que les phospholipides des lipoprotéines HDL présentent un rapport PC / PE et une teneur en AGPI plus élevés (Hermier *et al.* ; 1999a). Ce résultat suggère que chez l'oie polonaise, en réponse au gavage, l'exportation des triglycérides, phospholipides et AGPI est plus efficace, ce qui diminue leur disponibilité dans le foie pour la synthèse des membranes (Hermier *et al.*, 1999b). En revanche, en réponse au gavage de l'oie landaise, la synthèse des membranes est favorisée, ainsi que l'hypertrophie cellulaire résultant de l'accumulation des lipides.

Les différences d'aptitude à la stéatose observées entre espèces peuvent également être expliquées par des activités enzymatiques plus ou moins intenses. Ainsi l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase est plus importante chez le canard de Barbarie que chez le canard de Pékin, lorsque ceux-ci sont soumis à un gavage identique (Baéza *et al.*, 2005 ; Chartrin *et al.*, 2006).

Il semble donc que la lipogenèse soit plus accrue chez les canards de Barbarie, qui disposent de meilleures aptitudes à la formation de foie gras.

L'activité de la LPL a fait l'objet de plusieurs études. En début de gavage, l'activité de la LPL et les teneurs plasmatiques d'insuline et de glucagon sont identiques chez les canards de Barbarie, Pékin et mulards (Davail *et al.*, 2003). Mais après 10 jours de gavage, son activité chute chez les canards de Barbarie et mulards et reste stable chez les canards Pékin. En parallèle, les teneurs en glucagon et en insuline restent stables chez les deux premières espèces, mais celle en insuline augmente chez les canards Pékin. Il semble donc qu'une forte concentration en insuline maintienne l'activité de la LPL et favorise donc l'engraissement des tissus périphériques au détriment du développement de la stéatose hépatique. Ces résultats sont confirmés par une étude réalisée sur les mêmes espèces de canard, à différents délais post-prandiaux et différents stades de gavage (André *et al.*, 2007). De plus, chez l'oie landaise, après 14 jours de gavage, le poids de foie est négativement corrélé à l'activité de celle-ci (Davail *et al.*, 2000). Les auteurs suggèrent que les VLDL non hydrolysés par la LPL au niveau des tissus périphériques pourraient être de nouveau captés par le foie, et ainsi contribuer au développement de la stéatose.

### ***2.3.2. Variabilité génétique et sélection intra-espèce***

Dans une population de canards de Barbarie, des études ont porté sur la sélection directe pour le poids de foie, avec des mesures effectuées sur animaux gavés. Les valeurs estimées de l'héritabilité varient de 0,20 à 0,40 (Babilé, 1989, résultats rapportés par Poujardieu *et al.*, 1994 ; Mignon-Grasteau *et al.*, 1998).

Dans des populations de canard commun, trois études ont porté sur l'estimation de l'héritabilité de l'aptitude à la stéatose hépatique en réponse au gavage, mesurée sur des canards mulards (pour revue, voir Marie-Etancelin *et al.*, 2006).

L'héritabilité du poids de foie gras (variabilité génétique additive de la voie femelle uniquement) varie entre 0,09 (Larzul, 2002a et b), 0,17 (Poujardieu *et al.*, 1994) et 0,18 (Marie-Etancelin *et al.*, 2011). Les auteurs notent que les différences observées peuvent provenir des différences dans les souches étudiées, les conditions d'élevage et de gavage, et les modèles statistiques utilisés. En terme de corrélation génétique, le poids de foie est peu lié

au poids vif de l'animal en début de gavage ( $-0,14 < r_g < 0$ ) (Poujardieu *et al.*, 1994 ; Larzul, 2002a et b). Il apparaît donc qu'une sélection sur le poids des animaux avant gavage (des canards communs ou des mulards) conduirait à une évolution du poids de foie limitée voire défavorable.

### **Conclusion :**

D'une manière générale, le développement de la stéatose hépatique alimentaire chez les palmipèdes repose sur un déséquilibre entre la synthèse et la sécrétion des lipides vers les tissus périphériques, favorisant leur accumulation dans le foie. Les mécanismes à l'origine de l'aptitude à la stéatose sont multiples, et impliquent des régulations enzymatique et hormonale de la lipogenèse *de novo*, de la sécrétion des lipides néo-synthétisés par la voie plasmatique vers les tissus périphériques et de la capacité de dépôt des acides gras après hydrolyse enzymatique des triglycérides. De nombreux facteurs de variation de la mise en place de la stéatose hépatique des palmipèdes sont décrits dans la bibliographie, et permettent d'expliquer les différences d'aptitude à la production de foie gras entre les espèces de canards et d'oies. Il demeure pourtant une forte variabilité du poids de foie, au sein même d'un lot de gavage. Cette variabilité pourrait être réduite par la sélection des animaux les plus aptes à la production de foies gras, sur la base d'indicateurs de capacité à la stéatose hépatique.

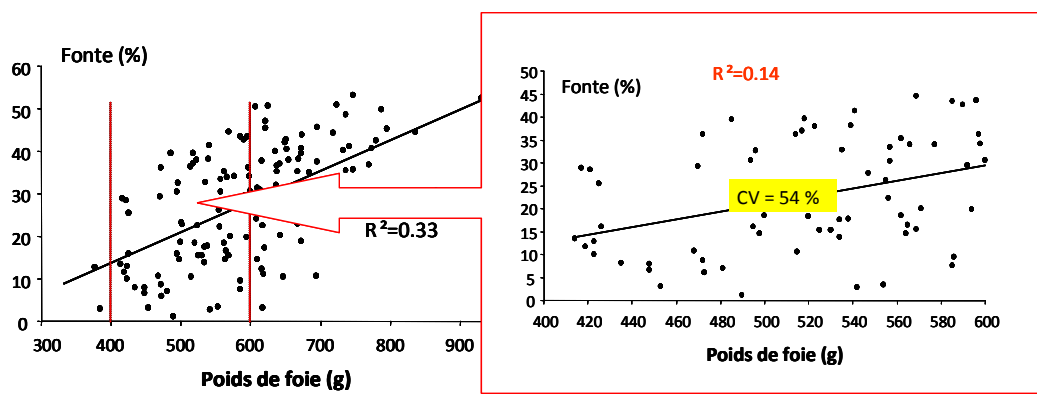
## **3. La fonte lipidique à la cuisson du foie gras**

La capacité à retenir les lipides lors de la cuisson constitue la principale qualité technologique du foie gras. La fonte se traduit par une exsudation de nature essentiellement lipidique qui a lieu lors des traitements thermiques de conservation : pasteurisation ou stérilisation.

### **3.1. Les enjeux liés à la fonte lipidique à la cuisson**

Le taux de fonte lipidique à la cuisson est soumis à une réglementation publiée dans le Journal Officiel de la République Française. En effet, le décret n° 93-999 du 9 août 1993,





**Figure 9** : Expression de la variabilité de la fonte lipidique du foie gras de canard.

CV : Coefficient de variation.

relatif aux préparations à base de foie gras, stipule que les produits à dénomination ‘foie gras entier’ ne doivent pas comporter plus de 30% de graisse exsudée. Parmi les produits issus du gavage des palmipèdes, les produits à dénomination ‘foie gras entier’ ont la meilleure valeur ajoutée, deux fois plus importante que le foie gras en bloc (Comité Interprofessionnel du Foie Gras, 2011). De l’aptitude à la transformation des foies gras dépend donc la rentabilité de la chaîne de production. La maîtrise du rendement à la cuisson est donc primordiale pour la filière ‘foie gras’.

De plus, la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson induit une hétérogénéité des produits finis. Dans un contexte industriel d’automatisation, l’uniformité de l’unité de vente est primordiale tant pour le transformateur que pour le consommateur. Cette variabilité reste limitée pour des gammes de poids de foies gras faibles, puis augmente pour des gammes de poids plus élevées (Figure 9).

Aujourd’hui, le poids de foie est la seule clé de tri objective disponible pour les transformateurs permettant de limiter la variabilité de la fonte à la cuisson. En industrie, un tri sur des paramètres de texture, appréciée manuellement par des personnes qualifiées et entraînées, est également effectué. Mais dans la mesure où ce tri est dépendant de l’opérateur, cela demeure une clé de tri subjective. Les résultats de la figure 9 montrent par ailleurs que dans la gamme de poids de foie généralement retenue pour la transformation en foie entier, la variabilité de la fonte à la cuisson peut être élevée (54% de coefficient de variation dans cet exemple), alors que le poids de foie n’explique que 14% de cette variabilité. De fait, dans un lot unique pour lequel les conditions d’élevage, de gavage et d’abattage ont été standardisées au mieux, plus de 80% de la variabilité de la fonte du foie gras dans la zone de poids à forte valeur ajoutée ne sont pas maîtrisés.

Enfin, du point de vue du consommateur, une fonte à la cuisson excessive cause une dépréciation visuelle influençant directement la décision d’achat.

Il est donc primordial pour l’ensemble de la filière ‘foie gras’ de mesurer, comprendre et maîtriser la fonte lipidique à la cuisson.

### 3.2. Méthodes d'évaluation de la fonte à la cuisson

Les méthodes de mesure de la fonte à la cuisson sont employées par les transformateurs comme un moyen de prédiction de sorte à orienter la matière première vers la chaîne de production la plus adaptée. Elles sont également utilisées en laboratoire pour évaluer le rendement technologique des produits finis, qui sera alors utilisé comme un facteur de comparaison dans les études sur le déterminisme de la fonte.

Les principales méthodes d'évaluation de la fonte à la cuisson sont la mesure en verrine, le test 'pilulier' et le qualimètre (mis au point par Salladre - GIE France Oie Gras - et Fourcade - Inserm).

La mesure en verrine est effectuée après pasteurisation du foie gras dans un autoclave à eau. Il s'agit de la méthode utilisée dans les expérimentations du laboratoire. Elle est réalisée dans une pièce climatisée à 10°C. Après ouverture des verrines, la graisse exsudée en périphérie du produit est retirée et le rendement technologique est déterminé par le rapport du poids de foie cuit sans la graisse exsudée sur le poids de foie avant cuisson. Même si il est difficile d'obtenir des informations sur les barèmes exacts de température employés dans l'industrie, le mode de cuisson utilisé dans notre étude est très similaire à celui utilisé dans l'industrie. Dans ce sens, il s'agit d'un très bon indicateur de la fonte des foies gras entiers vendus en verrine.

Le test 'pilulier' est pratiqué par certaines entreprises de transformation de foies gras entiers. Il s'agit de l'un des critères de sélection pour la transformation. Une petite portion de foie est prélevée, déposée dans un pilulier et placée dans un four pendant un court laps de temps. Ce test permet d'évaluer la fonte à la cuisson et semble être un bon indicateur (Goullieux, 2007).

Le qualimètre est également utilisé par certaines entreprises, mais dans une moindre mesure que le test 'pilulier'. Il s'agit d'un appareil de mesure de l'impédance électrique entre deux électrodes qui sont positionnées dans le foie gras. L'impédance représente la résistance dans le cas d'un courant alternatif et s'exprime en Ohm. Les lipides augmentent la résistance au passage du courant : donc en mesurant l'impédance, le qualimètre indique l'état d'engraissement. En partant de l'hypothèse que plus un foie gras est riche en lipides, plus il

est susceptible de fondre, cette mesure constitue un élément de prédiction de la fonte à la cuisson. Néanmoins, son utilisation est limitée car les résultats sont très dépendants de la température et ne permettent pas de trier correctement les foies gras au moment de l'éviscération. De plus, Babilé et Auvergne (1986) ont montré que la grande variabilité des résultats obtenus et le pourcentage élevé d'erreurs limitaient fortement l'intérêt d'un usage en industrie.

L'évaluation de la fonte à la cuisson par les méthodes en verrine ou en pilulier est dépendante des conditions de chauffage : température et durée. Néanmoins, dans des conditions similaires, il existe une bonne corrélation entre les deux méthodes ( $r^2 = 0,78$ ) (Goullieux, 2007).

### 3.3. Facteurs de variation de la fonte à la cuisson

#### *3.3.1. Facteurs biologiques de variation de la fonte lipidique à la cuisson*

##### 3.3.1.1. Déterminisme génétique de la fonte lipidique à la cuisson

Les principales espèces de palmipèdes utilisées pour la production de foie gras sont l'oie landaise (*Anser anser*), le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) et très majoritairement le canard mulard (*Cairina moschata* x *Anas platyrhynchos*). En termes d'aptitudes au gavage et à la transformation, les foies gras issus de ces différentes espèces diffèrent principalement par le poids de foie chaud et le taux de fonte à la cuisson (Blum *et al.*, 1992).

Les foies gras d'oie sont ceux pour lesquels la fonte lipidique à la cuisson est la plus limitée. Bien que les foies d'oie présentent des poids supérieurs à ceux des autres espèces (en moyenne 800 grammes), leur taux d'engraissement est le plus faible (54,6 % du poids de foie). Le moindre taux de lipides explique en partie le niveau moyen plus faible de la fonte à la cuisson.

Les foies gras issus de canards de Barbarie sont les plus légers (en moyenne 500 grammes), et ce sont pourtant ceux dont la tendance à la fonte à la cuisson est la plus élevée. Leur moins bonne aptitude à la transformation s'explique sans doute par un taux d'engraissement plus élevé que les autres espèces (62,6 %).

Les foies gras issus de canards mulards se situent en position intermédiaire en ce qui concerne les performances de poids de foie (en moyenne 600 grammes) et de taux de fonte. Le taux d'engraissement intermédiaire des foies gras issus de mulard (60,5 %) est à mettre en relation avec leur position intermédiaire entre le canard de Barbarie et l'oie pour la fonte lipidique à la cuisson.

Les canards mulards issus de mères de type génétique Tsaiya montrent de meilleures qualités technologiques avec un taux de fonte inférieur aux autres types (canards mulards issus de femelles croisées ou de femelles Pékin), quelle que soit la température de cuisson : 55°C ou 105°C (Setiawan, 1994). Mais lorsque les analyses statistiques sont réalisées en corrigeant les résultats par le poids de foie en covariance, l'effet du type génétique n'est plus significatif.

L'héritabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard a été estimée par Babilé (1989) et Poujardieu *et al.* (1994) à 0,18 et 0,22 respectivement, avec une corrélation génétique avec le poids de foie très importante (0,89 et 0,98).

Plus récemment, des études portant sur l'héritabilité de la qualité technologique ainsi que sur la recherche de zones chromosomiques à effet quantitatif ('QTL' pour 'Quantitative Trait Locus') associées à ces paramètres, ont été menées chez le canard mulard. Le taux de fonte présente une héritabilité moyenne sur la voie maternelle (0,17) et faible sur la voie paternelle (0,09) (Marie-Etancelin *et al.*, 2008 et 2011). Dans le cadre du même dispositif expérimental, il a été démontré que la corrélation génétique entre le poids de foie et le taux de fonte est élevée et positive ; elle est comparable entre les deux voies parentales :  $+0,80 \pm 0,07$  dans la lignée 'commune' et  $+0,78 \pm 0,13$  dans la lignée 'Barbarie' (Marie-Etancelin *et al.*, 2008 et 2011). Une recherche de QTL notamment sur la qualité technologique du foie gras de canard mulard a été menée (Kileh-Wais *et al.*, 2010). Ainsi, 34 QTL spécifiques des caractères d'aptitude au gavage et de qualité des produits ont pu être définis.

### 3.3.1.2. Le poids et la composition biochimique

Chez l'oie et le canard, il existe une corrélation positive entre le poids de foie et le taux de fonte lipidique à la cuisson (Nir et Nitsan, 1976 ; Barraud et Salladarre, 1980 ; Babilé, 1989 ; Blum *et al.*, 1990 ; Rousselot-Pailley *et al.*, 1993 ; Roussely *et al.*, 1993).

De la même façon, le taux de lipides est corrélé avec la fonte à la cuisson (Rousselot-Pailley *et al.*, 1992), sur une large gamme de poids de foie. Il semble que plus l'engraissement du foie est important, plus celui-ci est susceptible de fondre à la cuisson. Néanmoins, à poids de foie équivalents, une grande variabilité est observée dans la réponse au traitement thermique.

Le rapport protéines / lipides est relié à la qualité technologique des foies gras d'oie (Blum *et al.*, 1990). Il traduirait la capacité des structures non lipidiques à maintenir les inclusions lipidiques et ainsi réduire la fonte à la cuisson. Une forte corrélation est trouvée entre le rendement technologique et le rapport protéines / lipides chez le canard de Barbarie ( $r = 0,78$  à  $55^{\circ}\text{C}$  et  $r = 0,83$  à  $105^{\circ}\text{C}$ ) et le canard Mulard ( $r = 0,91$  à  $55^{\circ}\text{C}$  et  $r = 0,93$  à  $105^{\circ}\text{C}$ ) (Baudonnet, 1993). Chez l'oie, le taux de fonte est corrélé négativement avec les protéines ( $r = -0,71$ ) et les phospholipides ( $r = -0,63$ ) (Nir et Nitsan, 1976 ; Blum *et al.*, 1990).

L'hypothèse d'une fragilité des membranes des hépatocytes a longtemps été évoquée pour expliquer la susceptibilité de certains foies gras à fondre à la cuisson. Dans le but de vérifier cette hypothèse, la composition biochimique des membranes des hépatocytes a été analysée en relation avec les performances technologiques du foie gras d'oie (Cazeils *et al.*, 1999a). Le rapport cholestérol / phospholipides membranaires semble être un bon indicateur de la fonte, avec une corrélation de  $-0,73$  entre les deux (Cazeils *et al.*, 1999b). L'augmentation de ce rapport traduit un accroissement du taux de cholestérol de sorte à compenser la plus grande fluidité des membranes apportée par les insaturations (Cooper et Strauss, 1984). Le rapport cholestérol / phospholipides membranaires pourrait donc traduire des mécanismes de compensation de la fragilité des membranes induite par le gavage. Si ce résultat présente une forte significativité dans les études portant sur le foie gras d'oie, il n'a pas pu être vérifié chez le canard (Molee, 2006). Enfin, l'analyse du profil en acides gras des phospholipides membranaires en relation avec le rendement technologique n'a pas permis d'établir un lien entre ces deux paramètres (Cazeils, 2000).

### 3.3.1.3. Les facteurs d'élevage

Une détérioration du rendement technologique est observée chez des animaux plus jeunes à l'entrée en gavage, chez le canard mulard (Auvergne, 1992; Setiawan, 1994) ou le canard de Barbarie (Auvergne, 1992). Une mise en gavage précoce (11 vs 13 semaines)

pourrait impliquer des animaux présentant une ‘compétition’ entre la fin de la croissance musculaire et le développement de la stéatose. En effet, la masse musculaire pectorale des palmipèdes se développe tardivement, entre 10 et 12 semaines mais le développement reste notable jusqu’à 15 semaines (Auvergne, 1992). L’alimentation riche en glucides et pauvre en protéines au cours du gavage induit une compétition entre les besoins protéiques des muscles pectoraux et les besoins du foie en réponse à la lipogenèse accrue (Babilé *et al.*, 1993, 1994). Cela se traduit par un faible rapport lipides/protéines qui pourrait être à l’origine d’une détérioration des performances technologiques à la cuisson des foies gras de canard (Baudonnet, 1993 ; Setiawan, 1994).

La préparation au gavage consiste à rationner les animaux en limitant le temps d’accès à la nourriture, disponible alors à volonté dans un laps de temps réduit. Cette restriction conduit les animaux à s’alimenter rapidement et de façon importante et permet la dilatation de l’œsophage ce qui favorisera l’ingestion de grandes quantités de nourriture dès le début du gavage chez le canard (Babilé *et al.*, 1987) comme chez l’oie (Dubois *et al.*, 1996). Une ingestion importante dès le début du gavage du canard mulard (Baudonnet, 1993) et du canard de Barbarie (Babilé, 1989) permet un gain de poids de foie supérieur et tend à améliorer la qualité technologique des foies gras. A l’inverse, une diminution de l’ingestion de maïs en fin de gavage diminue la qualité technologique des foies gras de canard mulard de 5 points, mais s’explique en partie par une différence de poids de foie (Latil *et al.*, 1996).

Une étude sur la conduite de gavage a comparé les performances technologiques des foies gras de canards mulards selon deux modalités : un gavage à 24 repas d’intensité forte et un gavage à 28 repas d’intensité faible (Setiawan, 1994). Pour des poids de foie équivalents, l’augmentation de la fonte à la cuisson dans le cas du gavage moins intensif pourrait être liée au nombre plus important de repas et donc à l’allongement de la durée de gavage. Labie *et al.* (1989) avaient par ailleurs observé par des méthodes histologiques des ruptures des membranes cellulaires après deux semaines de gavage. De la même façon, chez l’oie, un allongement de la durée de gavage (14, 18 et 21 jours) pénalise le rendement à la cuisson (Bouillier-Oudot *et al.*, 2002) mais induit également des foies de poids plus important. A poids de foie équivalents, une diminution de la fonte à la cuisson est associée à une teneur inférieure de l’enzyme lactate déshydrogénase (LDH) sérique chez des animaux gavés pendant 14 jours par rapport à ceux gavés 20 jours (Babilé, 1989). L’augmentation de la teneur en LDH sérique chez les animaux gavés sur une plus longue durée est le signe de

lésions des membranes cellulaires et d'un accroissement de leur perméabilité (Auvergne, 1992).

De façon à pallier une carence en protéines lors du gavage, l'alimentation peut être complétée en protéines ou acides aminés. Des études ont montré que l'enrichissement de l'alimentation en protéines au cours du gavage de l'oie améliore le gain de poids de foie ainsi que le rendement technologique d'environ 10 points (Blum *et al.*, 1971 ; Nir *et al.*, 1973 ; Nitsan *et al.*, 1973). L'addition de protéines dans l'alimentation des animaux en gavage compenserait le déficit et permettrait selon Nir et Nitsan (1976), d'assurer une bonne intégrité des membranes qui résisteraient alors mieux aux traitements thermiques.

### *3.3.2. Facteurs technologiques de la variation de la fonte lipidique à la cuisson*

#### *3.3.2.1.. Les facteurs *peri mortem**

Les facteurs *peri mortem*, par le stress et les modifications physiologiques qu'ils peuvent induire chez les animaux, sont susceptibles d'influencer la qualité technologique des produits finis.

Le respect d'une certaine durée de jeûne précédant l'abattage des animaux assure la vidange du tractus digestif, et en conséquence diminue le risque de contamination microbienne des carcasses lors de l'éviscération. Cette vidange est plus rapide chez l'oie (Rousselot-Pailley *et al.*, 1992) que chez le canard de Barbarie (Auvergne *et al.*, 1993), avec respectivement des délais nécessaires d'environ 12 et 24 heures. Lors d'une augmentation du délai post-prandial avant l'abattage, une diminution du poids vif des animaux et du poids de foie est observée, associée à une moindre qualité technologique du foie gras d'oie de 6 points (Rousselot-Pailley *et al.*, 1992) comme du foie gras de canard de Barbarie de 10 points en moyenne (Babilé, 1989 ; Baudonnet-Lenfant *et al.*, 1991).

Les conditions d'abattage influencent la construction des qualités des produits carnés, et de nombreuses études ont été menées sur l'impact du stress lié aux conditions de transport et déchargement. Chez le canard mulard, une augmentation du temps de transport (150 vs 30 minutes) améliore la qualité technologique du foie gras de 6 points, sans que ce résultat ne



soit relié à son poids (Fernandez *et al.*, 2011). En revanche, dans les mêmes conditions expérimentales, il a été montré que le temps d'attente sur le quai de déchargement (15 vs 120 minutes) n'a pas d'impact sur la fonte lipidique à la cuisson. Enfin, une étude de Fernandez *et al.* (2009) a comparé différentes méthodes d'étourdissement (dans un bain d'eau électrifiée, par pince bitemporale – 'tête seulement', mécanique avec une broche perforante à ressort et en atmosphère contrôlée) en relation avec la qualité technologique des foies gras. Il en ressort que la fonte à la cuisson du foie gras de canard ou d'oie n'est pas modifiée par la méthode d'étourdissement employée.

### 3.3.2.2. Les facteurs *post mortem*

Lorsque le foie est retiré de la carcasse immédiatement en fin de chaîne d'abattage, l'éviscération est dite 'à chaud'. En revanche, si la carcasse est placée en réfrigération avant le retrait du foie, on parle d'éviscération 'à froid'. La pratique de l'éviscération à froid détériore le rendement technologique et favorise donc la fonte lipidique à la cuisson du foie gras d'oie (Babilé et Auvergne, 1986 ; Rousselot-Pailley *et al.*, 1992) et de canard mulard (Castaing et Robin, 1990). L'hypothèse avancée par les auteurs pour expliquer la détérioration du rendement technologique dans ce cas porte sur un catabolisme glucidique accru, cela concernerait notamment les activités glycolytiques avec une diminution des réserves en glycogène au cours de la réfrigération (Bouillier-Oudot *et al.*, 2004). Néanmoins, les mécanismes reliant la teneur en glycogène à la fonte lipidique à la cuisson ne sont pas identifiés à notre connaissance.

Une comparaison de l'impact de la valeur stérilisatrice sur le rendement technologique a été réalisée à partir de foies gras d'oie (Leprettre *et al.*, 2002). Les résultats montrent une diminution de la fonte à la cuisson pour des valeurs stérilisatrices plus faibles (0,25 vs 0,49 et 0,77), tout en assurant une bonne stabilité des conserves. Plus récemment, une comparaison des effets de la pasteurisation et la stérilisation sur le niveau et la variabilité de la fonte à la cuisson de foie gras de canard a été conduite au laboratoire. Les résultats ont montré que la stérilisation induit une fonte à la cuisson plus élevée que la pasteurisation de 10 points environ, sans que la variabilité inter individuelle ne soit modifiée puisque les deux valeurs de rendement indiquent un coefficient de corrélation de 0,90 ( $p < 0,001$ ).

## Conclusion

L'étude bibliographique sur la fonte lipidique à la cuisson du foie gras révèle que de nombreuses études ont été menées sur le sujet et ont permis de définir des facteurs de variation, notamment zootechniques et technologiques. Pourtant, lorsque ces facteurs sont maîtrisés, il demeure une variabilité importante et non contrôlée du rendement technologique des foies gras. C'est la raison pour laquelle nous avons conduit ces travaux sur le déterminisme biologique de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard.

La mise en relation de la biochimie des lipides, et plus particulièrement des acides gras, avec le rendement technologique n'a pas permis de faire émerger des hypothèses de mécanismes à l'origine de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard. Aussi, nous proposons dans ce travail de nous intéresser à la caractérisation biochimique du foie gras, et au profil en triglycérides en particulier. En effet, les triglycérides représentent plus de 95 % des lipides de réserve. Aussi, une étude plus détaillée de ces molécules, notamment en termes de degré d'insaturation et du nombre d'atomes de carbone des acides gras les constituant, serait susceptible d'apporter des éléments dans la construction biologique de l'aptitude à la transformation des foies gras.

L'implication de la fraction protéique dans les mécanismes de la fonte lipidique à la cuisson est très peu documentée. Les seules informations dont nous disposons concernent la teneur en protéines du foie gras, et son évolution au cours du gavage. Certaines hypothèses ont porté sur l'implication des lipides membranaires dans la fonte lipidique à la cuisson, ou dans un autre registre, sur l'implication d'enzymes du métabolisme énergétique dans l'aptitude à la stéatose hépatique. Nous proposons ici de compléter ces travaux en développant une approche protéomique. L'application des méthodes d'études du protéome est basée sur des hypothèses émises sur l'implication des protéines du métabolisme énergétique et/ou des protéines membranaires dans le phénomène de fonte lipidique. Pour répondre aux contraintes propres à chacune des fractions auxquelles appartiennent ces groupes de protéines, nous avons travaillé en combinant différentes méthodes.

Enfin, des observations histologiques montrent une variabilité de l'état d'engraissement hépatique (nombre et taille des vacuoles lipidiques) exprimée en partie par le

niveau d'engraissement, lui-même lié à la fonte lipidique (Bouiller-Oudot *et al.*, 2006). De plus, même si la capacité de la structure non lipidique à 'retenir' les lipides lors de la cuisson du foie gras a souvent été évoquée, aucune étude en ce sens n'a été publiée à ce jour. Aussi, dans le volet portant sur l'histologie, nous proposons de combiner différentes méthodes de fixation du tissu et de colorations nous permettant des observations à différentes échelles : celle de la structure non lipidique, celle des gouttelettes lipidiques et enfin à l'échelle moléculaire.

*MATÉRIELS*  
*ET MÉTHODES*

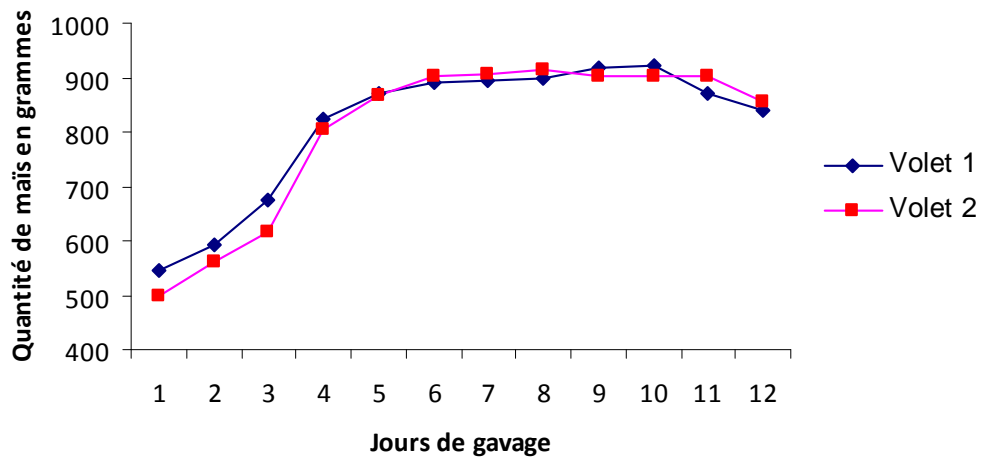
## 1. Itinéraire zootechnique

L'ensemble de l'itinéraire zootechnique a été conduit à la station expérimentale de l'Etablissement Public Local d'Enseignement et de Formation Professionnelle Agricole (EPLEFPA) de Périgueux (Dordogne). Cet itinéraire, de l'élevage à l'abattage, est commun aux deux essais conduits dans le cadre du projet, les différences introduites dans le second volet seront détaillées. Les animaux expérimentaux sont des canards mulards mâles. Il s'agit d'hybrides intergénériques *Cairina moschata* x *Anas platyrhynchos* issus de lignées commerciales (« Pkl x Mmg », commercialisée par ORVIA). L'effectif est de 120 animaux dans le premier volet et de 160 animaux dans le deuxième volet.

### 1.1. Elevage et préparation au gavage

Les canetons sont produits dans le couvoir du lycée agricole de Périgueux. Ils sont mis en élevage dès l'âge de 1 jour, dans un bâtiment isolé. Ils sont en période de démarrage pendant 4 à 5 semaines, avec un aliment 'premier âge' à volonté. La densité dans le bâtiment est de 4.8 canards par m<sup>2</sup>, les animaux sont maintenus sur aire paillée. Entre 4 et 5 semaines, selon les conditions météorologiques, les canetons accèdent progressivement à un parcours de démarrage sur lequel ils disposent de 3 m<sup>2</sup> minimum par animal. Pendant ce laps de temps, une transition alimentaire est effectuée entre l'aliment 'premier âge' et l'aliment 'croissance'. A partir de 5 semaines, les animaux sont nourris à volonté avec cet aliment qui sera distribué jusqu'à la fin de la période d'élevage. A 6 semaines, les canetons quittent la structure de démarrage (bâtiment + parcours) et rejoignent un parcours en plein air avec 5 m<sup>2</sup> minimum par animal. A partir de 10 semaines, les animaux sont alimentés selon la technique du rationnement horaire : ils ont accès à l'aliment à volonté pendant 1 heure chaque 24 heures.

En matière de prophylaxie, les animaux sont vaccinés contre le Choléra du canard, et ils reçoivent pour prévenir le parasitisme, des traitements 'd'acidification' : de l'eau de boisson à deux périodes pendant la durée d'élevage, à 7 et 11 semaines. La distribution d'eau acidifiée s'étale sur 5 jours pour chaque traitement.



**Figure 10** : Courbes de gavage des deux volets : la quantité de maïs exprimée en grammes est représentée pour chaque jour de gavage.

## 1.2. Gavage

Le gavage consiste à administrer à l'aide d'une gaveuse hydraulique une ration de maïs composée à 42% de grains et 58% de farine, deux fois par jour. La quantité de maïs est croissante jusqu'à atteindre un plateau au sixième jour de gavage (Figure 10).

Selon la recommandation du Conseil de l'Europe (article 10-7), l'EPLEFPA de Périgueux s'est équipé de logements collectifs (5 animaux par cage) pour le gavage en remplacement des logements individuels. C'est la raison pour laquelle les animaux ont été gavés en logements individuels lors du premier essai et en logements collectifs lors du second essai. Le gavage des animaux est réalisé dans une salle équipée d'un système de ventilation dynamique.

## 1.3. Abattage et éviscération

Dans la mesure où l'élevage et l'abattage des animaux ont lieu sur le même site, la durée du transport n'excède pas cinq minutes. Les canards sont conduits à l'abattoir par groupes de 20 individus, à raison de quatre animaux par cages de transport, de sorte à limiter le temps d'attente sur le quai de déchargement. La durée de jeûne avant abattage, qui correspond à l'intervalle de temps entre le dernier repas et la saignée de l'animal, est de 10 heures dans les deux volets.

Après pesée individuelle, les canards sont étourdis à l'aide d'une pince bitemporale délivrant un courant électrique continu de 90 V d'intensité variable, appliqué durant 5 secondes. Ils sont ensuite saignés, échaudés et plumés. L'éviscération a lieu à chaud, à la fin du processus d'abattage soit approximativement à 20 minutes *post mortem*. Les foies sont délicatement retirés de la carcasse de l'animal, pesés à chaud et après les différents prélèvements pour analyses, ils sont placés en réfrigération sur un lit de glace pendant 6 heures.

## 1.4. Transformation des foies gras

Après réfrigération, les foies font l'objet d'un classement en trois catégories : 'Extra', 'Première classe' et 'Tout venant', selon la présence de défauts d'aspect et de texture et

également leur poids. La première catégorie 'Extra' comprend les foies sans défaut d'apparence, avec une texture correcte ; elle correspond à la meilleure valorisation, le plus souvent en foie gras entiers. La deuxième catégorie 'Sélection' comprend les foies présentant de légers défauts d'aspects (tels que des hématomes) qui ne pourront être commercialisés en foie entier. La troisième catégorie 'Tout venant' comprend les foies présentant des défauts majeurs, ou un poids trop important, et qui seront alors orientés vers une transformation en bloc de foie gras. Les foies gras sont ensuite déveinés, et découpés transversalement en trois parties incluant les deux lobes.

Dans la partie centrale des deux lobes, un morceau d'environ 200 grammes est prélevé pour être mis en verrine. Dans chaque verrine, du sel (12 g / kg) et du poivre (2 g / kg) sont ajoutés puis les verrines sont scellées et placées dans un autoclave à eau ('Brouillon Process', Sainte Bazeille, France).

Le programme de cuisson est réalisé de sorte à obtenir une valeur pasteurisatrice de 170. Il consiste en une montée en température en 15 minutes pour passer de la température initiale de l'autoclave de 70°C jusqu'à la valeur de 85°C maintenue pendant 47 minutes sous une pression de 1 bar. Le refroidissement est réalisé par un courant d'eau froide pendant 30 minutes.

Des contrôles de température sont effectués : deux sondes sont placées dans des verrines 'test' contenant du foie gras, et une directement dans l'eau. A la fin du cycle de cuisson, les verrines sont stockées à 4°C, pendant au minimum un mois jusqu'à l'ouverture pour calcul du rendement technologique.

### 1.5. Rendement technologique

La mesure du rendement technologique est réalisée dans une pièce climatisée à 10°C. Les verrines sont ouvertes et la graisse exsudée en périphérie du produit cuit est délicatement retirée.

Le rendement technologique est alors déterminé selon l'expression suivante :  
Rendement technologique = (Poids de foie cuit pesé sans la graisse exsudée périphérique / Poids de foie avant cuisson) \*100.



**Tableau 2** : Répartition des prélèvements d'échantillons pour les analyses physico-chimiques, biochimiques, protéomiques et histologiques dans les deux volets du projet. Pour chaque partie, le nombre d'échantillons analysés est indiqué.

		Après l'éviscération, à 20 minutes <i>post mortem</i>	Après refroidissement, à 6 heures <i>post mortem</i>	Après cuisson
Premier volet	pH, T°C	n = 97	n = 97	
	Biochimie		n = 46	
	Protéomique	n = 18	n = 18	
	Histologie et microscopie	n = 10	n = 10	n = 10
Second volet	pH, T°C	n = 160	n = 160	
	Biochimie	n = 24	n = 24	n = 24
	Protéomique	n = 24	n = 24	
	Histologie et microscopie	n = 24		n = 24

## 2. Echantillonnage

Les prélèvements pour les mesures biochimiques sont effectués après le refroidissement des foies, c'est-à-dire à 6 heures *post mortem*. Le morceau de foie prélevé d'environ 50 grammes est immédiatement congelé dans de l'azote liquide. Il est ensuite broyé à l'aide d'un broyeur Dangoumau, à l'azote liquide pour homogénéiser le prélèvement et ce broyat est conservé à -20°C jusqu'aux analyses.

Les prélèvements pour l'analyse protéomique, l'histologie et la microscopie sont réalisés le plus tôt possible après l'abattage, à 20 minutes *post mortem* au moment de l'éviscération, et après refroidissement, à 6 heures *post mortem*. Les échantillons destinés à l'analyse protéomique sont immédiatement plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Les prélèvements pour l'histologie et la microscopie sont fixés comme décrit dans le paragraphe 6.1. Pour l'histologie, la microscopie et une partie de la biochimie du volet 2, des prélèvements ont été effectués après cuisson (Tableau 2).

## 3. Mesures biochimiques

### 3.1. Détermination du taux de matière sèche

Le taux de matière sèche (MS) des foies gras est déterminé par dessiccation du broyat à l'étuve à 105°C pendant 24 heures (J.O.C.E., 1971). Du sable est ajouté à la coupelle de façon à augmenter les surfaces d'échange. La coupelle est ensuite placée dans un dessiccateur à température ambiante afin de refroidir l'échantillon avant la pesée.

Le taux de matière sèche est alors déterminé selon la formule suivante :

$MS = ((\text{Poids sec} - \text{Tare de la coupelle}) / \text{Prise d'essai}) * 100$  (exprimée en pourcentage du poids de foie).

### 3.2. Détermination du taux de Matières Azotées Totales (MAT)

Le taux de MAT est déterminé par la méthode de Dumas (AOAC, 1989) à l'aide d'un appareil Leco FP 428. La technique implique une combustion totale à 850°C, en présence d'oxygène, de la matrice protéique du foie gras contenu dans une feuille d'étain. Les gaz et

sous-produits de la combustion sont condensés à 6°C et homogénéisés. Une partie aliquote est prélevée et entraînée par un courant d'hélium à travers différents supports assurant une réduction du NO en N<sub>2</sub> et la captation du CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O. L'azote est alors détecté et quantifié à l'aide d'un détecteur calorimétrique. L'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) est utilisé pour la calibration. La teneur en matière azotée totale est estimée par le calcul suivant :  
MAT = N x 6.25. Elle est exprimée en pourcentage du poids de foie.

### 3.3. Détermination du taux de lipides

Les lipides totaux sont extraits à froid dans un mélange chloroforme / méthanol (2/1, v/v) selon la méthode décrite par Folch *et al.* (1957), à raison de 1 gramme de foie gras broyé dans 50 ml de volume d'extraction.

Les échantillons broyés sont homogénéisés dans le mélange de solvant à l'aide d'un homogénéiseur de type 'Polytron'. Pour optimiser l'extraction, le mélange obtenu est maintenu à 4°C pendant la nuit. Il est ensuite filtré sur un papier filtre de type Durieux. La séparation de phase est assurée par l'ajout d'une solution saline, du chlorure de sodium à 0.73%. La phase inférieure chloroformique contenant les lipides extraits est alors soutirée et filtrée sur papier filtre Whatman 1PS. Une faible quantité de sulfate de sodium est ajoutée afin de capter d'éventuelles molécules d'eau pouvant subsister dans cette phase. La quantification de lipides totaux est alors réalisée par gravimétrie après évaporation de la phase chloroformique d'une fraction aliquote.

Le taux est déterminé selon la formule suivante :

Lipides totaux =  $\left( \frac{(2/3 * V_{cm}) * P}{(Pe * v)} \right) * 100$ , exprimés en pourcentage du poids de foie

Avec : V<sub>cm</sub> = volume de chloroforme – méthanol employé pour l'extraction

P = Masse de lipides contenus dans le tube (poids du tube - tare)

Pe = Prise d'essai en grammes

v = volume d'évaporation

### 3.4. Détermination du taux de collagène

La détermination du taux de collagène est adaptée de Woessner (1961) et Etherington et Sims (1981). La teneur en collagène est déterminée par dosage de l'hydroxyproline dans un

échantillon de foie gras broyé et lyophilisé. L'hydroxyproline est libérée des liaisons peptidiques par hydrolyse acide, en présence d'acide chlorhydrique 6 N, à 115°C pendant la nuit. Le filtrat est recueilli et neutralisé par ajout de soude à 1.2 N. Une solution de chloramine T à 0.05 M est ajoutée afin d'oxyder l'hydroxyproline en dérivés du type pyrrole. L'excédent de chloramine est détruit par ajout d'acide perchlorique 3.15 M. Le réactif d'Ehrlich est ensuite ajouté : le paradiaminoacétyl-4-benzaldéhyde qu'il contient va réagir spécifiquement avec les dérivés du type pyrrole pour former un composé rouge - brun absorbant à 557 nm. L'absorbance du mélange est mesurée à une longueur d'onde de 557 nm contre un blanc de H<sub>2</sub>O. Une gamme étalon d'hydroxyproline est effectuée et traitée de la même façon que les échantillons.

### 3.5. Dosage de l'acide lactique et du glycogène

#### *3.5.1. Extraction*

Dans un premier temps, environ deux grammes de foie gras sont broyés à l'ultra Turax dans 10 ml d'acide perchlorique à 0.5 M. Deux rinçages de la tige du broyeur sont effectués avec 2.5 ml de solution. Le broyat est centrifugé pendant 20 minutes, à 600 g, à une température de 4°C. Les tubes sont placés dix minutes à -20°C de façon à faciliter l'élimination du 'fat-cake' formé pendant la centrifugation. L'échantillon est remis en suspension, et quatre aliquotes de 0.5 ml sont prélevées pour le dosage du glycogène (par le dosage du glucose total). Le broyat est alors une nouvelle fois centrifugé pendant 15 minutes à 2500 g, à une température de 4°C. Six aliquotes de 1 ml sont prélevées dans le surnageant pour le dosage du lactate.

Les aliquotes sont conservées à -20°C jusqu'aux analyses.

#### *3.5.2. Hydrolyse du glycogène*

L'hydrolyse est réalisée selon la méthode de Dalrymple et Hamm (1973). Un volume de 50 µl de KOH à 30% est ajouté dans chaque tube contenant l'aliquote de 1 ml pour neutraliser. Après agitation, un volume de 1 ml de solution d'amyloglucosidase à 2 mg/ml de tampon acétate 0.2 M pH 4.8 (SIGMA grade II) est ajouté. Les tubes sont placés au bain-marie pour une incubation de trois heures à 38°C, avec une agitation régulière. Ensuite, 100µl

de solution d'acide perchlorique à 3 M sont ajoutés de sorte à stopper les réactions enzymatiques et les tubes sont placés dans de la glace fondante pendant 10 minutes, puis centrifugés pendant 15 minutes à 4000 tours / minute. Le surnageant est filtré et récupéré puis stocké à -20°C jusqu'aux dosages.

### ***3.5.3. Dosage du glucose***

Pour le dosage du glucose (correspondant au glucose libre et au glucose issu de l'hydrolyse du glycogène), il faut tout d'abord ajouter 2 ml de tampon NAD à 100 µl de prise d'essai. Le tampon NAD est préparé comme suit : à partir de tampon triéthanolamine hydrochlorique 0.1 M pH 7.6, de l'EDTA (2 g / litre) et du MgCl<sub>2</sub> (2 g / litre) sont ajoutés. Le pH est ajusté à 7.6. Puis, du NAD (40 mg pour 100 ml de tampon) et de l'ATP (170 mg pour 100 ml de tampon) sont ajoutés. Enfin, les enzymes sont ajoutées au tampon : la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) (100 UI par ml) et l'hexokinase (100 UI par ml). L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 340 nm, correspondant à l'absorbance du NADH,H<sup>+</sup> formé lors de l'action de la G6PDH sur le glucose-6-phosphate.

### ***3.5.4. Dosage du lactate***

Le dosage du lactate est réalisé selon la méthode de Bergmeyer (1974). A partir d'un volume de 2 ml de tampon Tris Base 0.2 M Hydrazine 0.2 M et NAD 2mg/ml, pH 9, un volume de 0.1 ml de prise d'essai est ajouté. L'enzyme lactate déshydrogénase est ajoutée à une concentration de 10 U par essai. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 340 nm, correspondant à l'absorbance du NADH, H<sup>+</sup> formé lors de l'action de la lactate déshydrogénase sur le L-lactate.

## **3.6. Mesure de l'oxydation des lipides**

La mesure de l'oxydation des lipides est réalisée selon la méthode de Lynch et Frei (1993) adaptée par Mercier *et al.* (1998). Les aldéhydes formés par oxydation des acides gras poly-insaturés, dont le malonic dialdehyde, réagissent en milieu acide avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose qui absorbe à une longueur d'onde de 535 nm.

Le broyat de foie gras est incubé avec une solution de TBA à 1% et une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 2.8% pendant 30 minutes à 80°C. Après refroidissement dans de la glace fondante pendant 15 minutes, une solution de n-butanol est ajoutée afin d'extraire les aldéhydes. Le mélange est centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 4000 g. Le surnageant est récupéré et son absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 535 nm contre un blanc de butanol, avec une correction de la ligne de base à 760 nm. Une gamme étalon de tétraméthoxypropane est préparée et traitée de la même façon que les échantillons.

### 3.7. Mesure de l'oxydation des protéines

La mesure du taux de carbonyles est réalisée selon la méthode d'Olivier *et al.* (1987). Les groupements carbonyles sont des produits de l'oxydation des protéines, ils réagissent avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) pour former un composé jaune - orange qui absorbe à une longueur d'onde de 370 nm.

Dans un premier temps, une solution de TCA à 50% est ajoutée aux échantillons de foie gras broyés de façon à précipiter les protéines. Ensuite, le culot est récupéré et incubé avec une solution de DNPH à température ambiante pendant 1 heure, sous agitation. Le mélange est centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 4000 g. Le culot est ensuite incubé avec un mélange éthanol - acétate d'éthyl (1/1, v/v). Cette opération de lavage du DNPH non fixé est répétée 3 fois. Après le dernier lavage, les tubes sont placés sous hotte aspirante de sorte à sécher le culot qui est ensuite solubilisé dans une solution de guanidine à 6 M à température ambiante pendant 30 minutes. Après centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment, le surnageant est récupéré et son absorbance est mesurée à 370 nm contre un blanc de guanidine à 6 M. Une seconde mesure d'absorbance est réalisée à une longueur d'onde de 280 nm, dans une cuve en quartz.

Le taux de carbonyles formés est exprimé en nanomoles de DNPH fixé par mg de protéines selon la formule :

$$\text{Taux de carbonyles} = (\text{DO}_{370\text{nm}} * 0.65) / (\text{DO}_{280\text{nm}} * 21)$$

avec 0.65 : l'absorbance à 280nm d'une solution de BSA à 1 mg/ml dans de la guanidine  
21 : coefficient d'extinction molaire du DNPH en  $\text{mM}^{-1}$  à une longueur d'onde de 370 nm.

## 4. Analyse de la fraction lipidique du foie gras

### 4.1. Profil en lipides neutres

La séparation des lipides neutres est réalisée par chromatographie en phase gazeuse, après développement des dérivés silylés selon une méthode adaptée de Myher et Kuksis (1984). Les lipides neutres sont principalement constitués des mono-, di- et triglycérides, des acides gras libres, de cholestérol et d'esters de cholestérol.

A partir de l'extrait lipidique total préparé selon la méthode de Folch *et al.* (1957), 50  $\mu\text{l}$  sont prélevés (contenant entre 50 et 150  $\mu\text{g}$  de lipides) et 10  $\mu\text{l}$  d'un étalon interne, la tricaprine (Sigma), sont déposés dans un pilulier muni d'un tube réducteur de 150  $\mu\text{l}$ . Après homogénéisation, le chloroforme est évaporé sous azote pendant environ 4 minutes. Puis, 100  $\mu\text{l}$  de réactif Tri-Sil/BSA (Pierce Chem. Co, Rockford, USA) sont ajoutés. Le tube est aussitôt fermé avec un bouchon en téflon afin d'éviter toute évaporation et il est placé dans un dessiccateur car les dérivés silylés sont instables en présence d'humidité. La silylation est complète au bout de 60 minutes.

L'appareil utilisé pour la séparation des dérivés silylés est un chromatographe Hewlett Packard 5890 Série II muni d'un détecteur à ionisation de flamme, relié à un intégrateur Hewlett Packard 3396 Série II pour le traitement des informations. Les dérivés silylés sont injectés à l'aide d'un injecteur automatique en mode « on-column » dans une pré-colonne de 0.50 m de long et 0.53 mm de diamètre remplie de silice désactivée. Elle est reliée à une colonne apolaire (DB5, J&W Scientific, USA) de 15 m de long et de 0.32 mm de diamètre et 0.1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de film à 5% de diphényl et 95% de diméthylpolysiloxane qui réagissent avec les lipides neutres. Le gaz vecteur est l'hydrogène et son débit est fixé à 2 ml par minutes. Le détecteur à ionisation de flammes est maintenu à 340°C tout au long de l'analyse.

Le chromatographe est calibré à l'aide d'une gamme étalon de lipides neutres (Sigma) et la tricaprine (Sigma) ajoutée comme étalon interne permet de corriger le rendement de silylation. Les chromatogrammes sont intégrés et quantifiés à l'aide du logiciel HP Core chemistation 2. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la teneur en lipides totaux.

## 4.2. Profil en triglycérides

La séparation des triglycérides est réalisée selon une adaptation de la méthode de Héron *et al.* (2007), par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de type HP Series 1100 HPLC Chromatograph (Agilent). L'HPLC est associée à un détecteur à diffusion de lumière de type DDL 31 (EUROSEP Instruments). L'utilisation de cette méthode permet la séparation des TG selon les acides gras qui estérifient le glycérol :

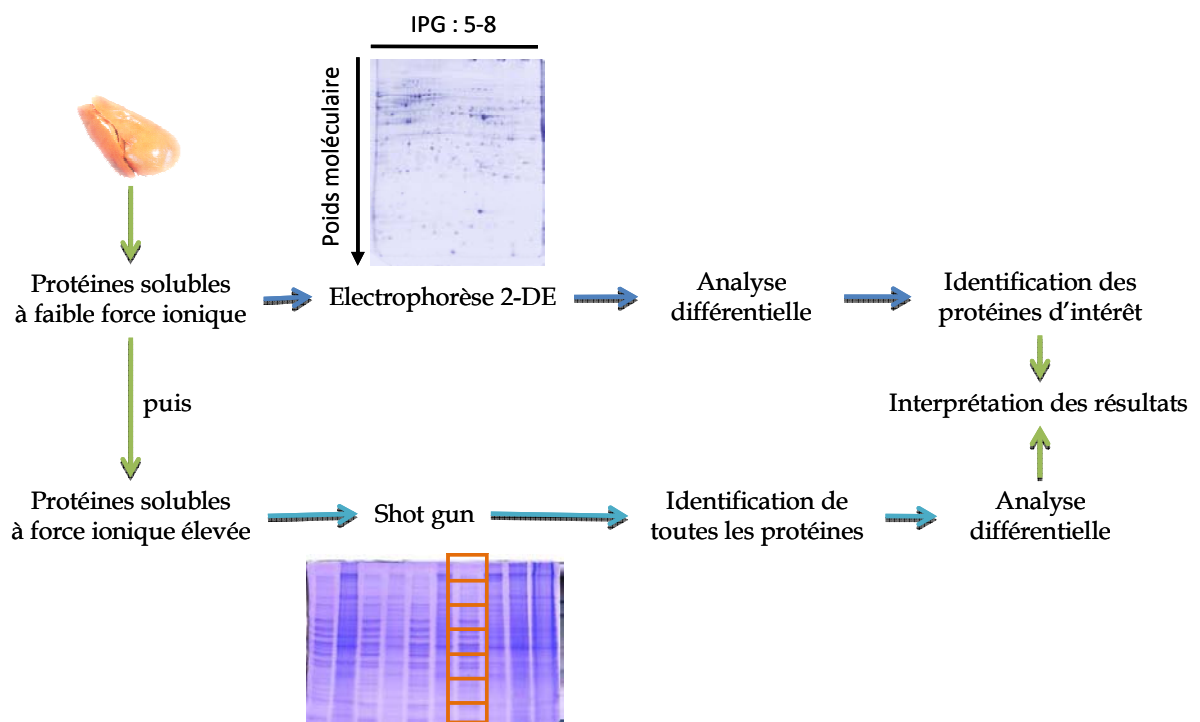
- linoleyl 1, di-oleyl 2,3 glycerol (LOO),
- palmitoleyl 1, di-oleyl 2,3- glycerol (PoOO),
- palmityl 1, oleyl 2, linoleyl 3, glycerol (POL),
- di-palmityl 1,2, linoleyl 3, glycerol (PPL),
- trioleine (OOO),
- palmityl 1, di-oleyl 2,3, glycerol (POO),
- palmityl 1,3, oleyl 2, glycerol (POP),
- tripalmitine (PPP),
- stearyl 1, di-oleyl 2,3, glycerol (SOO),
- palmityl 1, oleyl 2, stearyl 3, glycerol (POS),
- di-palmityl 1,2, stearyl 3, glycerol (PPS),
- palmityl 1, di-stearyl 2,3, glycerol (PSS) / palmityl 2, di-stearyl 1,3, glycerol (SPS).

A partir de l'extrait lipidique total obtenu selon la méthode de Folch *et al.* (1957), 20 µl sont prélevés et introduits manuellement dans le circuit par une valve à Rhéodine de 20 µl. Le flux est contrôlé à 1 ml par minute et la température de la colonne est maintenue à 15°C. L'injection est réalisée sur une colonne de type Kinetex™ de 100 Å (C18) : la granulométrie est de 2.5 µm et les dimensions de 150 \* 4.6 mm (Phenomenex Products, Kinetex™, USA). Pour assurer une bonne séparation des différentes classes de triglycérides, un gradient binaire de migration combinant l'acétonitrile et le dichlorométhane est employé.

Dans le détecteur de diffusion de lumière, les températures de nébulisation et d'évaporation du mélange acétonitrile / dichlorométhane sont respectivement de 40 et 50°C, avec un photomultiplicateur d'une sensibilité de 600.

Après intégration des données, les résultats obtenus sont exprimés en pourcentages de la teneur en lipides totaux.





**Figure 11** : Stratégie de l'analyse protéomique appliquée à l'étude de la fonte lipidique du foie gras de canard.

## 5. Analyse protéomique

Les hypothèses formulées sur le rôle des protéines dans le phénomène de fonte lipidique à la cuisson portaient sur l'implication de protéines du métabolisme, de protéines de structure ou encore de protéines membranaires. Ces différents types de protéines appartiennent à deux fractions aux propriétés de solubilité différentes. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de travailler à partir d'une extraction différentielle des protéines selon leur solubilité (Figure 11). Ensuite, nous avons adapté la méthode de séparation pour chacune des fractions. La fraction protéique soluble à faible force ionique (FS) a été analysée par électrophorèse bidimensionnelle couplée à de la spectrométrie de masse pour l'identification des protéines d'intérêt. La fraction protéique non soluble à faible force ionique (FNS) a été étudiée grâce à la méthode 'Shot-Gun' qui consiste à séparer les protéines selon leur poids moléculaire sur gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) avant d'identifier l'ensemble des protéines présentes dans les pistes.

### 5.1. Extraction et dosage des protéines du foie gras

#### *5.1.1. Etapes d'extraction*

L'extraction fractionnée est réalisée selon la méthode de Sayd *et al.* (2006). La prise d'essai est de 300 mg de foie gras broyé dans de l'azote liquide, à laquelle on ajoute une bille de verre et 1.2 ml de tampon Tris 40 mM HCl pH 7.4, soit un rapport poids / volume de 1/4. L'ensemble est homogénéisé pendant 1 heure à 4°C grâce au système d'agitation à billes Retsch MM2 (Retsch, Haan, Germany). Ensuite, les tubes sont centrifugés à 10 000g pendant 10 minutes, à 10°C. Le surnageant, correspondant à la fraction soluble à faible force ionique (FS), est prélevé et conservé à -80°C. Le culot est repris dans 1.2 ml de tampon Tris 40 mM HCl pH 7.4. L'ensemble est homogénéisé pendant 15 minutes à 4°C, et centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes, à 10°C comme précédemment. Cette étape de lavage (homogénéisation + centrifugation) est réalisée 4 fois au total. Enfin, lorsque le cinquième surnageant est éliminé, le culot est repris dans 1.2 ml de tampon Urée 7 M, Thiourée 2 M, Chaps 4% (poids/volume), dithiothréitol (DTT) 1% (poids/volume). L'ensemble est homogénéisé pendant 30 minutes à

**Tableau 3** : Programme d'isoélectrofocalisation utilisé pour la séparation des protéines de la fraction soluble à force ionique.

Etape 1	Etape 2	Etape 3	Etape 4	Etape 5	Etape 6	Etape 7
↗ 50 V	↗ 250 V	↗ 500 V	↗ 1000 V	↗ 1000 V	↗ 5000 V	↗ 5000 V
50 Vh	500 Vh	1 h	2 h	1000 Vh	4h30	60000 Vh

4°C, puis centrifugé à 10 000 g, pendant 10 minutes à 10°C. Le surnageant, correspondant à la fraction protéique non soluble à faible force ionique (FNS) est conservé à -80°C.

### *5.1.2. Dosage des protéines*

La teneur en protéines des FS et FNS est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). La gamme étalon est préparée avec de l'albumine serum bovine dans les mêmes conditions que les échantillons, avec le réactif de Bradford (BioRad). Après une incubation de 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc d'eau. Les concentrations en protéines des échantillons sont calculées à partir de la droite étalon.

## 5.2. Analyse de la fraction protéique soluble à faible force ionique en électrophorèse bidimensionnelle

### *5.2.1. Réhydratation des strips et isoélectrofocalisation*

Au cours de cette étape, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique sur une bande de gel (strip) de gradient de pH de 5 à 8 de 17cm, grâce au système Protean IEF cell system (Bio-RAD). L'échantillon est préparé dans un tampon de solubilisation / réhydratation, à raison de 600 µg de protéines déposés. La solution mère est composée d'urée 7M, de thiourée 2M, de CHAPS 2%. Le tampon de solubilisation / réhydratation est préparé à partir de la solution mère, il contient du DTT 1%, des ampholytes pH 5-8 0,4% (v/v), des ampholytes pH 3-10 Non Linéaire 0,2% (v/v) et 0,0002% de Bleu de Bromophénol.

Après 30 minutes de réhydratation passive à 20 °C, de l'huile minérale (Bio-RAD) est déposée à chaque extrémité des strips. Ensuite, les strips sont réhydratés passivement pendant 16 heures. Puis, un papier Wicks (Bio-RAD) imbibé d'eau milliQ est déposé entre chaque électrode et extrémité de strip. Pendant 6 heures, les strips sont alors réhydratés avec un courant de 50V : il s'agit de la réhydratation active. Enfin, le programme d'isoélectrofocalisation est lancé, il comprend 7 étapes pour lesquelles la montée en voltage, la durée et le voltage sont définis (Tableau 3). A la fin de la première dimension, les strips sont rincés dans de l'eau milliQ et conservés à -20°C jusqu'à la mise en œuvre de la seconde dimension.

### *5.2.2. Equilibration*

Les solutions d'équilibration de dithiothréitol (DTT) et d'iodoacétamide sont préparées à partir d'une solution mère composée de Tris HCl 1,5M pH 8,8 50 mM, glycérol 30%, SDS 2% et de l'urée 6M.

La première incubation de 15 minutes est réalisée dans une solution de DTT 1%, la seconde incubation dans une solution d'iodoacétamide à 2.5% contenant quelques grains de bleu de bromophénol. Pour chaque incubation, les strips sont placées dans un tube contenant 10 ml de chaque solution. Les incubations se font sous hotte aspirante sur un plateau balancier, à température ambiante.

### *5.2.3. Mise en œuvre de la seconde dimension par SDS-PAGE*

Après l'équilibration, les strips sont rincés dans du tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS, pH 8.3), et sont ensuite déposés à la surface des gels SDS-PAGE d'une concentration en acrylamide de 12%. La migration en seconde dimension permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire. Elle est effectuée grâce au système Protean II XL system (Bio-Rad) à raison de 40V la première heure, puis à 110 V tout au long de la nuit. La migration est suspendue au moment où le front de migration atteint le bas du gel.

### *5.2.4. Coloration des gels au Bleu Brillant G 250.*

Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle sont colorés selon la méthode au Bleu Brillant G 250 (Morzel *et al.*, 2006 a). Pour chaque étape de coloration, un volume de 250 ml de solution est nécessaire par gel. La première étape de fixation se déroule en deux incubations de 30 minutes puis d'une heure, dans une solution à 30% d'éthanol et 2% d'acide phosphorique. Ensuite, deux lavages de 20 et 40 minutes sont effectués dans une solution à 2% d'acide phosphorique. Puis, l'équilibration dure 1 heure dans une solution à 2% d'acide phosphorique, 18% d'éthanol et 15% de sulfate d'ammonium. Enfin, 2.5 ml de solution de bleu brillant G250 à 2% sont ajoutés par gel. Les gels sont incubés 3 jours dans la solution de coloration et sont lavés trois fois dans de l'eau milliQ pendant 30 minutes.

### *5.2.5. Analyses informatique et statistique des gels*

Les gels sont scannés puis analysés grâce au logiciel ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). Le principe d'analyse est basé sur la détection des spots protéiques sur les gels. Le logiciel réalise alors un gel 'Master' représentant les spots détectés pour chaque condition de comparaison (*i.e.* les différents niveaux de fonte et temps *post mortem*). La comparaison des gels 'Master' deux à deux permet de déterminer quels spots présentent des intensités significativement différentes entre conditions d'analyse selon la méthode de Meunier *et al.* (2005). Les spots d'intérêt sont alors identifiés par spectrométrie de masse.

### *5.2.6. Identification en Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight (MALDI-TOF) (Plateforme d'exploration du métabolisme, INRA de Theix)*

**Prélèvement des spots.** Avant d'être excisés du gel d'électrophorèse, il est nécessaire de bien rincer le gel à l'eau milliQ. Les spots sont prélevés à l'aide de cônes de pipette découpés : l'excision doit être réalisée le plus près du spot pour éviter le bruit de fond. Les échantillons sont ensuite placés dans un tube eppendorf de 0.5 ml.

**Décoloration.** Le bleu utilisé lors de la coloration est éliminé par des bains successifs dans un tampon bicarbonate d'ammonium et acétonitrile. Dans un premier temps, un volume de 100µl de tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM – 5% d'acétonitrile est ajouté à chaque tube. Après une incubation de 30 minutes, le tampon est éliminé. Ensuite, un volume de 100 µl de tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM – 50% d'acétonitrile est ajouté à chaque tube. Après une incubation de 30 minutes, le tampon est éliminé. Cette dernière étape de lavage est répétée une seconde fois.

**Déshydratation des spots.** Les spots sont ensuite déshydratés par une incubation de 10 minutes dans un volume de 200 µl d'acétonitrile à 100%. L'acétonitrile est éliminé et les échantillons sont passés au Speed Vacuum pour éliminer le reste d'acétonitrile et compléter la déshydratation.

**Hydrolyse trypsique de la protéine.** La protéine est hydrolysée en peptides grâce à 150 ng d'enzyme. La solution de trypsine est préparée à 10 ng/ $\mu$ l dans un tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM. Un volume de 15  $\mu$ l de cette solution est ajouté dans chaque tube. L'incubation se déroule à une température de 37°C à l'étuve pendant la nuit.

**Extraction des peptides.** Les peptides sont extraits du gel avec un volume de 8  $\mu$ l d'acétonitrile. Les tubes sont homogénéisés au vortex et placés au bain d'ultrasons pendant 2 minutes. Ils sont ensuite placés en incubation 15 minutes à 37°C. Le milieu d'extraction est agité et traité aux ultrasons une dernière fois avant le dépôt sur la plaque.

**Préparation de la matrice et du calibrant.** Une solution de matrice CHCA (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans un solvant Acétonitrile/H<sub>2</sub>O/TFA (50/50/0.1). Cette préparation est homogénéisée par vortex puis centrifugée 2 minutes à 3000g afin d'éliminer les agrégats non dissous. Le calibrant (Peptide Mix 4, Proteomix, LaserBio labs, Sophia Antipolis, France) est préparé en prélevant un volume de 5  $\mu$ l dans un volume total de 50  $\mu$ l de matrice CHCA.

**Dépôt sur la plaque MALDI-TOF.** Tout d'abord, la plaque est nettoyée, sans frottement, à l'eau puis au savon et rincée à l'eau milliQ. Sur la cible, un volume de 1  $\mu$ l d'échantillon est déposé après avoir été agité au vortex, puis 1  $\mu$ l de matrice. Le dépôt doit sécher à l'air libre. Le mélange peptidique est alors cristallisé dans la matrice. Ensuite, un volume de 0.4  $\mu$ l de calibrant est déposé à 2 mm à droite de chaque échantillon. La plaque est alors prête à être introduite dans l'appareil MALDI-TOF.

Les identifications des spots d'intérêt sont réalisées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF (Voyager DE-Pro, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA, USA), mode « réflectron » et ionisation positive. Lors de l'analyse, les données concernant le calibrant sont récupérées et traitées par le logiciel DataExplorer (Applied Biosystems). Une calibration interne est également réalisée avec trois pics d'autolyse de la trypsine dont les rapports masse sur charge (m/z) sont connus : 842,509 ; 1045,564 ; 2211,104. L'ensemble des masses monoisotopiques peptidiques est extrait des spectres de masse et utilisé pour l'interrogation des banques de données à l'aide du logiciel Mascot. Les paramètres utilisés pour la recherche sont les suivants : un site maximum de clivage manqué par la trypsine, une tolérance de  $\pm$  25 ppm dans la précision de masse des peptides, et des modifications variables : oxydation des méthionines, carbamidométhylation des cystéines.

### *5.2.7. Identification en nano-LC-ESI-Trappe ionique (Plateforme d'exploration du métabolisme, INRA de Theix)*

Les échantillons ont été séparés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) nano débit (Dionex/LC Packing) et analysés sur un spectromètre de masse Nanoelectrospray-Ion-Trap (LCQ-DECA, ThermoElectron). L'HPLC est constituée de trois modules : un passeur d'échantillons (Famos ; LC Packings) relié à une boucle d'injection de 20 µl par une vanne 5 voies, une pompe microdébit permettant la pré-concentration des échantillons sur une colonne C18 (300 µm i.d x 1 mm, C18 PepMap 100, 5 µm, 100) également reliée à une vanne multivoies et enfin une nano HPLC (Ultimate) permettant de séparer l'échantillon sur une colonne nanocapillaire (i.d 75 µm, longueur de 15 cm, C18 PepMap 100, 3 µm, 100) en utilisant un gradient de 200 nl par minute.

Pour chaque échantillon, un volume de 6 µl est chargé dans la boucle d'injection en mode « µl peakup », puis après basculement de la vanne d'injection, l'échantillon est chargé dans la colonne de pré-concentration à l'aide du Switchos délivrant le solvant A (98/2 H<sub>2</sub>O/ACN, 0,06% v/v TFA) à un débit de 35 µl par minute. Au bout de trois minutes de concentration et de dessalage de l'échantillon, les peptides sont élués de la colonne et séparés en 45 minutes sur la colonne nanocapillaire grâce au gradient linéaire d'acétonitrile délivré par l'Ultimate (5 à 90% de solvant B (95/5 ACN/H<sub>2</sub>O, 0.5% acide formique)). Le spectromètre de masse permettant la caractérisation des peptides est couplé à l'HPLC grâce à une source nanospray comportant un support jonction liquide pour aiguille non métallisée (New Objective, Cambridge, MA, USA). L'electrospray est ainsi mis en place par l'application d'une tension de 2 kV sur l'aiguille. L'acquisition des données de masse, gérée par le logiciel Xcalibur (Thermo Electron) débute dès le début du gradient d'acétonitrile. Ainsi, les peptides ont été analysés par la méthode « data dependent triple-play » qui consiste à faire trois analyses à la suite. La première est une analyse « full scan » (400 – 1400 m/z) qui permet de détecter l'ion parent le plus intense. La deuxième consiste à faire un « zoom scan » sur l'ion parent sélectionné ( $\pm 5$  m/z) afin de déterminer son état de charge. La dernière analyse est l'isolation de l'ion et sa fragmentation avec une énergie de collision fixée à 35%. Les réglages d'acquisition de spectres (Exclusion Dynamique) sont également paramétrés pour optimiser la détection et le nombre de peptides détectés.



### 5.3. Analyse de la fraction protéique non soluble à faible force ionique (Plateforme de spectrométrie de masse, IPBS Toulouse)

L'analyse de la fraction protéique non soluble à faible force ionique est réalisée par l'approche 'Shot-Gun'. Pour cela, nous avons analysé les échantillons en les regroupant et en formant donc un échantillon 'Fonte faible', un 'Fonte élevée', ceci sur les prélèvements à 20 minutes et à 6 heures *post mortem*.

#### *5.3.1. Séparation des protéines*

Les extraits protéiques regroupés du groupe 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' subissent une réduction au DTT 20 mM, puis une alkylation dans une solution de chloroacétamide 60 mM. Les échantillons sont dissous selon un ratio 1 : 1 v/v dans du tampon Tris-HCL 62 mM pH 6.8, contenant du SDS à 2% (poids / volume), du  $\beta$ -mercaptoethanol à 5% et du glycérol à 10% (Laemmli, 1970). Les préparations sont alors incubées à 95°C pendant 5 minutes.

La séparation des protéines sur gel SDS-PAGE est réalisée selon Laemmli (1970) grâce au système Mini-Protean II electrophoresis (Biorad). Pour cela, 50  $\mu$ g de protéines sont déposées par piste, et la migration est réalisée à raison de 35 mA (à courant constant) par gel, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

Les gels sont alors colorés au Bleu Brillant de Coomassie G250 (PageBlue™ Protein Staining Solution, FERMENTAS).

#### *5.3.2. Hydrolyse enzymatique des protéines*

Chaque piste (une pour chacun des groupes de fonte, aux deux temps de prélèvements) est découpée en 10 bandes à l'aide d'un automate, puis incubée dans de l'ammonium bicarbonate 25 mM et de l'ACN 50% jusqu'à décoloration. Les bandes de gels sont ensuite séchées sous-vide à l'aide d'un SpeedVac à 45°C, puis réhydratées avec 30  $\mu$ l d'une solution de trypsine (10 ng/l dans une solution de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  à 50mM) sur la nuit à 37°C. Les peptides résultant de l'hydrolyse à la trypsine sont extraits du gel selon Borderie *et al.* (2003), puis séchés sous-vide à l'aide d'un SpeedVac et conservés à -20°C avant les identifications.

### 5.3.3. Identification des protéines en nano-LC-MS/MS

Les peptides issus de la digestion à la trypsine sont séparés et analysés par nano-LC-MS/MS, grâce au système Ultimate 3000 (Dionex, Amsterdam) couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Le mélange peptidique est chargé sur une colonne de pré-concentration (300  $\mu\text{m}$  i.d., longueur de 15 cm, C18 PepMap, Dionex) à l'aide d'un système délivrant le solvant A à 95% (5% d'acétonitrile et 0.2% d'acide formique) et le solvant B à 5% (80% d'acétonitrile et 0.2% d'acide formique). Les peptides sont élués en utilisant un gradient de solvant B de 5 à 50% pendant 80 minutes avec un débit de 300 nl par minute. Le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap en mode d'acquisition 'data-dependent', l'acquisition des données est gérée par le logiciel Xcalibur (version 2.0.6, Thermo Fisher Scientific). L'acquisition des spectres MS (300 – 2000  $m/z$ ) est réalisée avec l'Orbitrap. Pour chaque scan, les cinq ions les plus intenses sont analysés pour la fragmentation CID (pour 'Collision Induced Dissociation') et les fragments qui en résultent sont analysés en trappe (LTQ). Les réglages d'acquisition de spectres sont paramétrés pour optimiser la détection et le nombre de peptides détectés. Une liste de pics est créée pour chaque fraction analysée (chaque bande de gel), et les recherches à l'aide du logiciel Mascot sont réalisées.

### 5.3.4. Recherche dans les bases de données

Les spectres MS/MS obtenus sont comparés aux banques de données *Gallus gallus* (SwissProt-TrEmbl) et *Cairina moschata* – *Anas platyrhynchos* (NCBI). Les paramètres suivants ont été introduits dans la recherche : utilisation de la trypsine comme enzyme de digestion, instrument d'analyse 'ESI-Trap', tolérance de masse des peptides de 10 ppm, tolérance de 0.8 Da pour les MS/MS et l'oxydation de la méthionine a été intégrée comme possible modification.

### 5.3.5. Analyse bioinformatique

**Validation et semi-quantification.** Le logiciel MFPaQ (Bouyssié *et al.*, 2007) a été utilisé pour la validation des résultats, avec un taux de faux-positifs inférieur à 1.3%, et pour l'analyse des données. Ce logiciel est une application web qui permet la vérification des

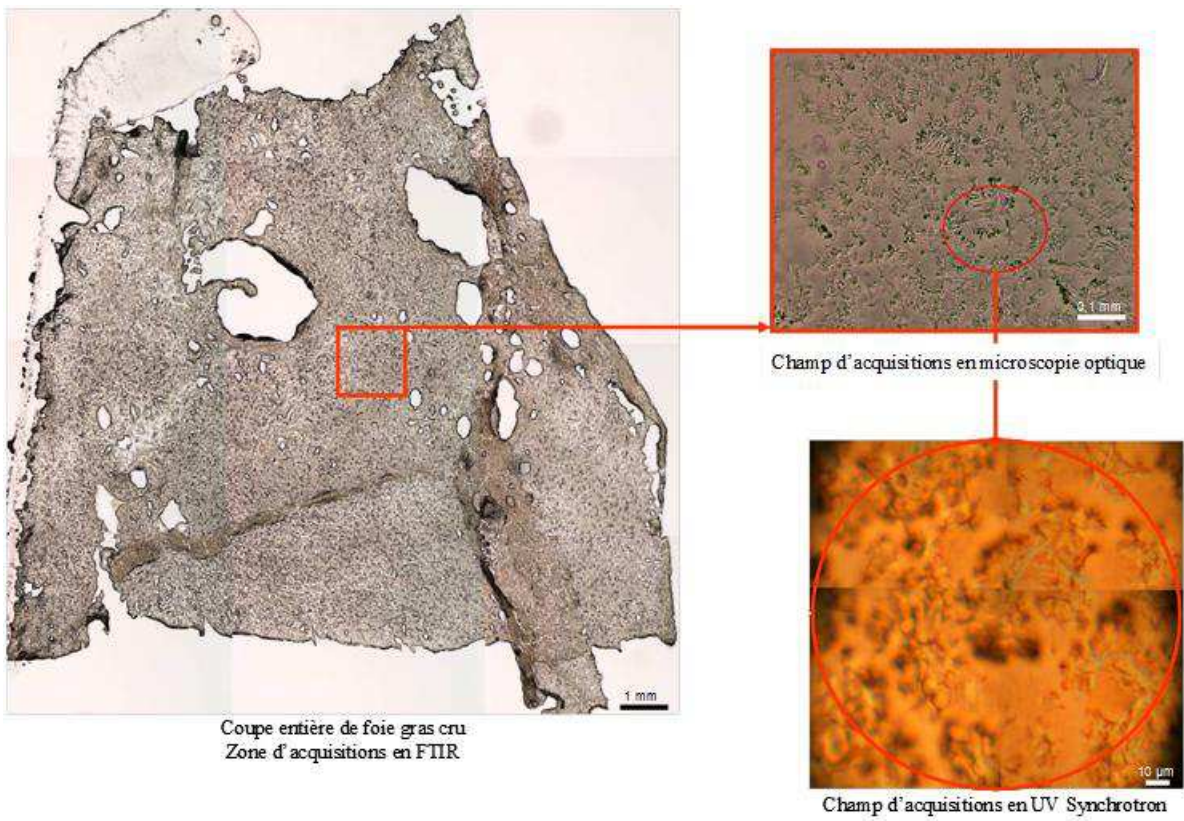
fichiers résultats de Mascot, ainsi que la semi-quantification des données basée sur le nombre de spectres de chaque protéine identifiée dans chacune des analyses (Liu *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2010). En prenant en compte le poids moléculaire des protéines, un indice d'abondance a été défini ; il s'agit du PAI (pour Protein Abundance Index). Il se calcule de la façon suivante :  $PAI = (\text{Nombre de spectres} / \text{Poids moléculaire}) \times 2500$ . Cet indice permet de semi-quantifier les protéines au sein de chaque échantillon et donc de les classer selon leur abondance relative.

**Analyse des fonctions biologiques.** La liste des protéines validées grâce au logiciel MFPaQ est importée dans le logiciel Protein Center (Proxeon, Odense, Danemark, <http://www.proteincenter.proxeon.com>). La première étape est le regroupement des protéines sur la base de 60% d'homologie de séquence. La comparaison de la distribution des groupes fonctionnels est alors réalisée grâce à la banque de données 'Gene Ontology', de sorte à déterminer si les répartitions des 'Compartiments cellulaires', 'Processus biologiques' et 'Fonctions moléculaires' sont aléatoires ou significatives.

#### 5.4. Validation des protéines candidates par Dot-Blot et Western-Blot

La validation des protéines candidates est réalisée à partir de la fraction protéique non soluble à faible force ionique. Parmi les 10 anticorps testés (provenant de chez Santa-Cruz Biotechnology), 5 réunissaient les conditions de spécificités à la protéine d'intérêt et de linéarité en fonction de la concentration en protéines déposée : les protéines ribosomales L10 (sc-100827) et S17 (sc-100835), la beta-énolase (sc-100811), la MIMP (sc-79980) et la calponine (sc-58707). Les analyses portant sur la protéine MIMP ont été effectuée en Western-Blot car les résultats montraient la présence de deux bandes, conformément aux indications du fournisseur.

Pour la réalisation des Western-Blots, les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide. Le transfert est réalisé dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol) pendant 30 minutes à 4°C, à 100V à l'aide du système Criterion Blotter BIORAD, sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, Amersham). Pour la réalisation des Dot-Blots, les extraits protéiques sont déposés directement sur la membrane. Le blocage de la membrane est réalisé à température ambiante pendant 1 heure



**Figure 12** : Les différentes échelles d'observation du foie gras.

dans un tampon phosphate salin (PBS pour 'Phosphate Buffered Saline') pH 7.5 contenant 3% de lait écrémé. L'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire est effectuée à 4°C sur la nuit ; les dilutions pour l'ensemble des anticorps primaires sont de 1:500. La membrane est ensuite rincée trois fois dans du tampon PBS, puis mise à incuber pendant 2 heures à température ambiante avec l'anticorps secondaire (dilution 1:10000). Elle est une dernière fois rincée trois fois dans du tampon TBS et mise à incuber à l'obscurité pendant 5 minutes dans le réactif de chimioluminescence (Super Signal<sup>®</sup> West Pico, THERMO PIERCE). La membrane est alors placée en contact avec un film qui sera développé par immersion dans une solution de révélation à 20% (AL4, Kodak), puis rincé dans une solution d'eau distillée et enfin une solution de fixation à 20% (LX24, Kodak). Les trois étapes de développement durent chacune une minute.

Une fois secs, les films sont scannés et l'analyse d'image est réalisée avec le logiciel ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare, Amersham). Un pool d'échantillons est utilisé comme référence. L'intensité des bandes est mesurée et est exprimée en pourcentage de la référence.

## **6. Microscopie et histologie du foie gras**

La combinaison de différentes méthodes de fixation du tissu et d'observations a permis une étude du foie gras, cru et cuit, à différentes échelles (Figure 12). Ces approches complémentaires nous ont permis d'obtenir des informations de l'échelle structurale à l'échelle moléculaire.

### **6.1. Fixation du tissu hépatique et réalisation des coupes**

#### ***6.1.1. Cryo-fixation et coupes à congélation***

La cryo-fixation fige physiquement les structures sans introduire de produit chimique, tout en limitant la formation de cristaux de glace. Pour cela, un cube de foie gras d'environ 1 cm<sup>3</sup> est prélevé et plongé dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide, à une température d'environ -160°C, pendant 30 secondes. L'échantillon est ensuite conservé à -80°C jusqu'à la réalisation des coupes.

A partir des échantillons cryo-fixés, des coupes à congélation d'une épaisseur de 10 µm sont réalisées à l'aide d'un Cryostat Microm HM 560, et recueillies sur lame de verre SuperFrost. Le montage avec lamelle altérerait les structures (notamment en agrandissant les trous présents naturellement dans le bloc d'échantillon), nous avons donc procédé aux acquisitions d'images des coupes sans lamelle.

### *6.1.2. Fixation chimique et coupes semi- et ultra-fines*

Un parallélépipède de foie gras d'environ 10 mm de longueur sur 3 mm de largeur est prélevé est plongé dans une solution de glutaraldéhyde à 2.5% dans du tampon cacodylate 0.1M pH 7.2 toute une nuit dans la glace fondante, puis à 4°C jusqu'à la réalisation des inclusions en résine.

Après la fixation chimique, la préparation des échantillons met en jeu les étapes suivantes : la post-fixation, la déshydratation, l'imprégnation et l'inclusion en résine. La post-fixation est réalisée sur les prélèvements préalablement fixés au glutaraldéhyde qui sont redécoupés en disques de 0.5 mm d'épaisseur. Ils sont tout d'abord rincés 5 minutes dans du tampon cacodylate de sodium 0.1 M pH 7.2. La post-fixation est réalisée par immersion dans de l'acide osmique à 1% dans du tampon cacodylate de sodium 0.1 M pH 7.2, pendant 12 heures à 4°C. Les échantillons sont ensuite rincés dans du tampon cacodylate de sodium pendant 5 minutes.

La déshydratation repose sur une succession d'immersion dans des solutions d'éthanol à concentrations croissantes, dont la durée et le nombre ont été réduits pour l'étude du foie gras afin de limiter l'éluion des lipides : 2 bains de 5 minutes dans de l'eau, puis 2 bains de 10 minutes dans, successivement, de l'éthanol à 70%, de l'éthanol à 95%, de l'éthanol à 100% et enfin de l'oxyde de propylène.

L'imprégnation est réalisée dans deux incubations de 30 minutes dans un mélange d'oxyde de propylène et de résine Epoxy TAAB (proportion 1:1); puis une dernière incubation dans de la résine Epoxy TAAB pure pendant 12 heures permet l'imprégnation totale de l'échantillon. La résine est déposée dans des moules et les échantillons sont disposés de façon parallèle au moule et donc au plan de coupe.

Les moules ainsi remplis sont laissés à l'étuve à 37°C pendant 2 heures puis à 60°C pendant 48 heures. Enfin, les blocs sont démoulés et prêts à être coupés.

A partir de ces blocs de résine, les coupes semi-fines d'une épaisseur de 1.5 µm et les coupes ultra-fines d'une épaisseur de 80 nm sont réalisées à l'ultra-microtome (Ultracut E de Reichert).

## 6.2. Colorations histologiques et cytologiques

### *6.2.1. Immunomarquage du collagène de type III*

A partir de coupes à congélation déposées sur lame de verre, l'immunomarquage débute avec une saturation des sites non spécifiques par une incubation de 10 minutes à température ambiante avec du sérum de chèvre à 10%. Les coupes sont ensuite incubées pendant 1 heure dans une chambre humide avec l'anticorps primaire dirigé contre le collagène de type III dilué au 1/40 (Anti-Collagen III Monoclonal Sigma C7805). Après 3 rinçages de 5 minutes dans du tampon PBS, les lames sont incubées à l'obscurité et à température ambiante avec l'anticorps secondaire marqué au fluorochrome Cyanine CY3, dilué au 1/150. Enfin, les lames sont rincées trois fois 5 minutes dans du tampon PBS.

Les coupes sont conservées à 4°C à l'obscurité jusqu'aux acquisitions d'images en microscopie optique fluorescence dans le filtre CY3 (554-568 nm).

### *6.2.2. Coloration Hématoxyline – Eosine*

La coloration Hématoxyline Éosine Safran (HES) permet de contraster les cellules en rose, les noyaux en violet et le tissu conjonctif en jaune. Elle est adaptée d'une coloration de base courante en histologie (Bancroft et Stevens, 1990). La coloration Hématoxyline – Eosine est réalisée sur les coupes à congélation. Elle se déroule en plusieurs étapes : une incubation de 5 minutes dans le réactif Hématoxyline de Harris, deux lavages d'une minute dans de l'eau ultra-pure, une incubation de 15 secondes dans une solution d'éosine et enfin deux lavages d'une minute dans de l'eau ultra-pure.

Les lames munies des coupes histologiques sont ensuite déshydratées sous hotte aspirante avant d'être stockées à 4°C à l'obscurité jusqu'aux acquisitions d'images en microscopie optique en fond clair.

### *6.2.3. Coloration au Bleu de Toluidine*

Le bleu de toluidine colore les cellules en bleu plus ou moins foncé selon la nature des composants cellulaires. Cette coloration est réalisée à partir des coupes à congélation ou des coupes semi-fines de matériel inclus en résine Epoxy. Les lames sont immergées dans une solution de Bleu à 1% maintenue à 60°C, pendant 10 minutes. Ensuite, trois lavages de 10 minutes à l'eau ultra-pure sont réalisés. Les lames sont ensuite déposées sous hotte aspirante et après séchage, elles sont stockées à 4°C jusqu'aux acquisitions d'images en microscopie optique en fond clair.

### *6.2.4. Coloration au Rouge de Nile*

Le Rouge de Nile est une sonde fluorescente qui se fixe sur les lipides de réserve. Le contraste des lipides est obtenu par incubation des coupes à congélation dans une solution de Rouge de Nile à 1µg / ml, pendant 30 minutes à l'obscurité, 4°C. Après trois lavages de 5 minutes dans du tampon PBS et un dans de l'eau ultra-pure, les lames sont déposées sous hotte aspirante jusqu'au séchage. Elles sont stockées à 4°C jusqu'aux acquisitions en microscopie optique à fluorescence en utilisant les cubes CY3 (554-568 nm) et FITC (490-525 nm).

### *6.2.5. Contrastes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb*

Les contrastes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb sont réalisés sur les coupes ultra-fines, recueillies sur des grilles de cuivre. Les coupes sont mises en contact avec la solution d'acétate d'uranyle à 50 % dans de l'éthanol, pendant 30 minutes à l'obscurité. Les grilles sont rincées à l'éthanol à 50 % goutte à goutte. Après séchage, elles sont mises en contact avec la solution de citrate de plomb pendant 15 minutes. Elles sont ensuite rincées dans une solution de soude à 0.02 N et dans quatre bains successifs d'eau ultra-pure.

Une fois séchées sous hotte aspirante, les lames sont prêtes pour les acquisitions d'images qui sont réalisées en microscopie électronique à transmission.



## 6.3. Acquisitions en microscopies optique et électronique

### *6.3.1. Acquisitions en microscopie optique*

Les observations en microscopie optique sont réalisées à l'aide d'un microscope Olympus BX 61 en fond clair et en fluorescence : filtres CY3 et FITC. Le microscope est équipé d'une platine motorisée et il est couplé à un système d'acquisition d'images numériques : une caméra de type Olympus DP 71 et le logiciel d'acquisition Olympus<sup>^</sup>Cell F.

Les acquisitions d'images à partir des coupes à congélation sont réalisées à raison de 20 champs d'analyse par coupe, à un grossissement de x 200.

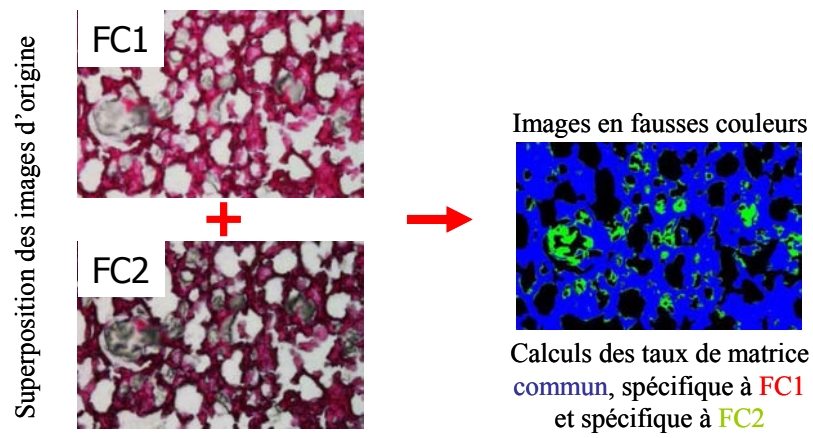
Les acquisitions d'images à partir des coupes semi-fines sont réalisées à raison de 10 champs d'analyse par coupe, à un grossissement de x 600, avec un objectif à immersion.

### *6.3.2. Acquisitions en microscopie électronique (Centre d'Imagerie Cellulaire Santé, Clermont-Ferrand, France)*

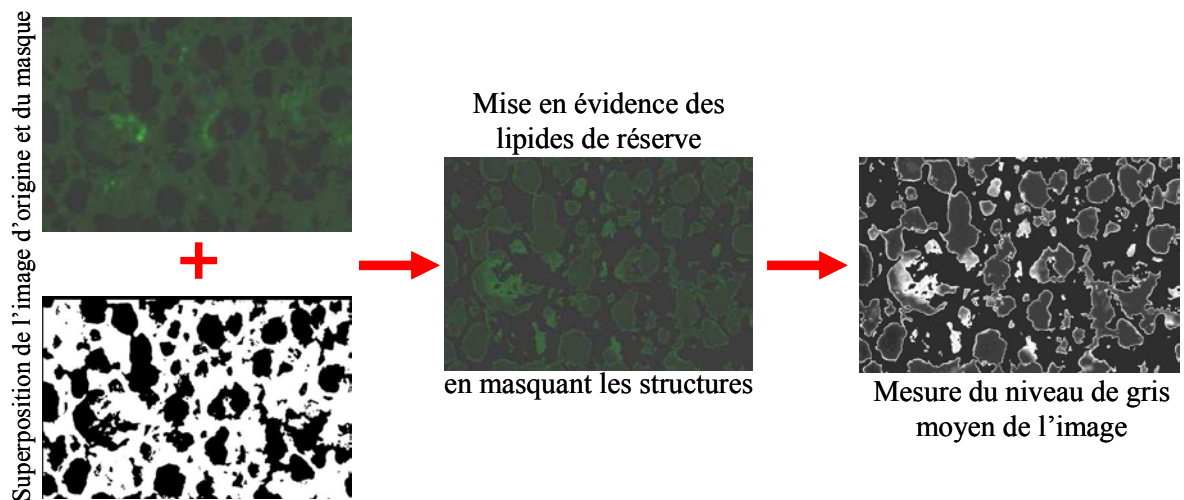
Le microscope utilisé pour les acquisitions en microscopie électronique à transmission est de type Hitachi (HM 7650), avec une tension d'accélération de 80 kV. Les micrographies ont été obtenues grâce à une caméra CCD de type Hamamatsu HR (1280 x 1024 pixels) en position latérale. La résolution du microscope est de 0.2 nm et le grandissement peut aller de x 2000 à x 200 000.

## 6.4. Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (Ligne SMIS du synchrotron Soleil, Saint-Aubin, France)

Les acquisitions de spectres Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR pour 'Fourier Transformed InfraRed) ont été réalisées à partir d'un microscope Nicolet iN10 MX (Thermo Scientific) mis à disposition par la ligne SMIS du synchrotron Soleil (Saint-Aubin, France). Les spectres ont été acquis sur l'ensemble de la coupe à congélation, pour chaque échantillon, avec une résolution spectrale de 8 cm<sup>-1</sup> et un pas de 25 μm. Les spectres FTIR ont été acquis et prétraités grâce au logiciel OMNIC (Thermo Scientific).



**Figure 13 :** Analyse des données obtenues selon la coloration des structures portant sur les teintes grisées en comparant les acquisitions réalisées selon le diaphragme partiellement (FC1) ou totalement ouvert (FC2).



**Figure 14 :** Analyse des données relatives aux lipides de réserve.

## 6.5. Microspectroscopie Ultraviolet (UV) en rayonnement synchrotron (Ligne DISCO du synchrotron Soleil, Saint-Aubin, France)

Les acquisitions de spectres UV ont été réalisées sur la ligne DISCO du synchrotron Soleil (Saint-Aubin, France). Les spectres ont été acquis sur des coupes à congélation de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, après excitation du tissu en lumière monochromatique (entre 270 et 330 nm). Le spectre de fluorescence provenant de chaque pixel excité est enregistré. L'intégration des données permet d'obtenir des cartes de 50  $\mu\text{m}$  par 50  $\mu\text{m}$  avec une résolution spatiale de 4  $\mu\text{m}$ . Les spectres d'autofluorescence ont été déconvolués grâce au logiciel Labspec (Jobin-Yvon, France).

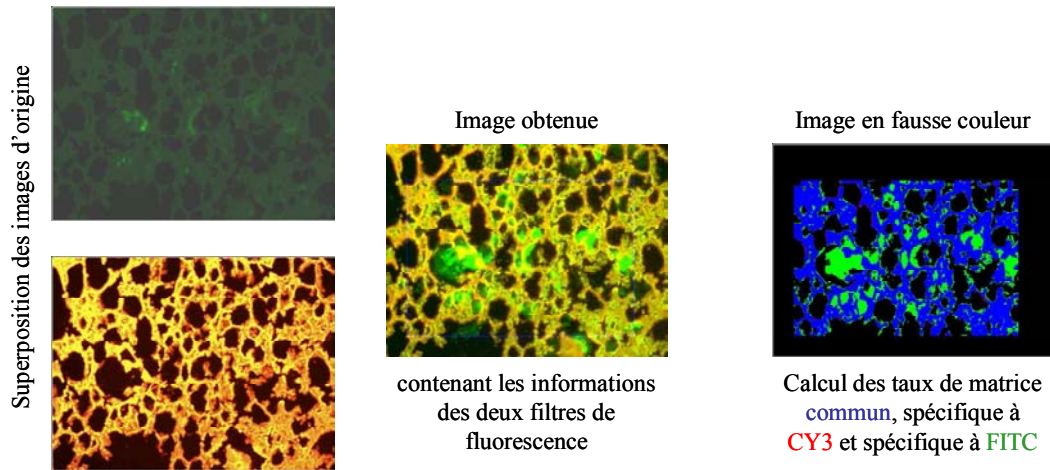
## 6.6. Analyses des données

### *6.6.1. Analyse des données obtenues à partir des coupes à congélation*

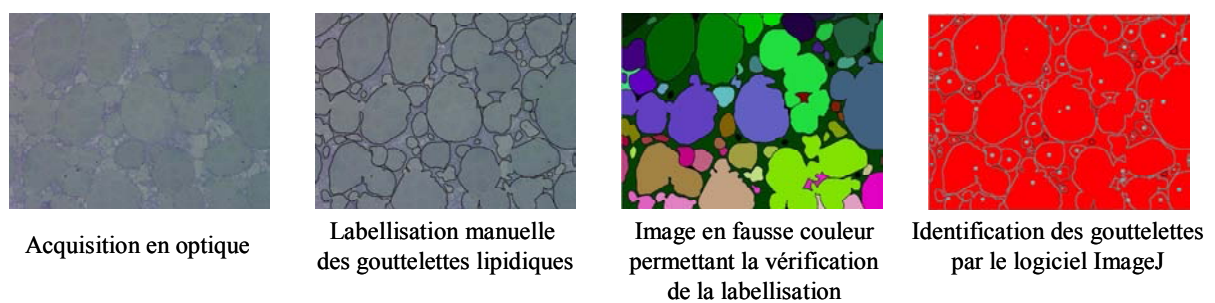
L'ensemble des images acquises en microscopie optique en fond clair et en fluorescence a été analysé avec les logiciels Matlab et ImageJ (1.42q Rasband, Maryland, USA, 1997-2009).

A partir des coupes à congélation, les paramètres mesurés sont le taux de matrice et le niveau de gris par champ d'acquisition. Des superpositions et recalages linéaires d'images ont été réalisés de façon à calculer des différences de taux de matrice entre deux conditions d'acquisitions. Le taux de matrice correspond à la composante non lipidique située autour des gouttelettes lipidiques intracellulaires et dans l'espace extracellulaire. Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser les différences observées en fond clair en coloration des structures non lipidiques. Pour cela, nous avons superposé les images correspondant aux deux conditions d'acquisitions pour chaque champ, constitué une image en fausse couleur, et dénombré le nombre de pixels - le taux de matrice - propre à chacune des conditions (Figure 13).

Dans un second temps, nous avons voulu mettre en évidence les lipides de réserve colorés en Rouge de Nile. Tout d'abord, le masque de l'image - correspondant au même champ en image binaire - a été superposé de sorte à masquer les structures non lipidiques. Puis le niveau de gris moyen a été mesuré sur l'image convertie en format 8 bits (Figure 14).



**Figure 15 :** Analyse des données obtenues selon la coloration des lipides portant sur la différence de marquage en fonction du filtre de fluorescence utilisé pour les observations.



**Figure 16 :** Etapes de l'analyse des images acquises en microscopie optique à partir des coupes semi-fines. L'analyse a été réalisée grâce au logiciel ImageJ.

Enfin, nous avons cherché à caractériser les différences de marquage des filtres CY3 et FITC en coloration des lipides Rouge de Nile. Pour cela, après avoir superposé les images acquises selon les deux filtres de fluorescence, nous avons obtenu une image en fausse couleur à partir de laquelle nous avons calculé le taux de matrice commun aux deux conditions et celui spécifique à chacune d'entre elles (Figure 15).

### *6.6.2. Analyse des données obtenues à partir des échantillons inclus en résine Epoxy*

L'ensemble des images acquises en microscopie optique à partir des inclusions en résine a été analysé avec le logiciel ImageJ (1.42q Rasband, Maryland, USA, 1997-2009).

A partir des coupes semi-fines, une méthode d'analyse a été développée (Figure 16) sur des images converties en niveau de gris 8 bits : une labellisation manuelle et individuelle des gouttelettes lipidiques, et des mesures morphologiques ont été réalisées. Pour chaque objet numérique labellisé - les gouttelettes lipidiques - les paramètres d'aire, de niveau de gris et d'indice de forme sont calculés. L'estimation de l'aire est basée sur le dénombrement de pixels formant l'objet d'analyse, les gouttelettes lipidiques. Le niveau de gris correspond à l'intensité de la coloration, il est compris entre 0 et 255. L'indice de forme est calculé selon la formule :  $\text{circularité} = 4 \pi (\text{aire} / \text{périmètre}^2)$ . Sa valeur est comprise entre 0 et 1, une valeur de 1 indique un cercle parfait.

### *6.6.3. Prétraitement des données spectrales UV et FTIR*

Les spectres UV nécessitaient une correction de la ligne de base, l'élimination des 'spikes', les rayonnements cosmiques détectés par l'appareil et enfin l'élimination du bruit de fond jusqu'à l'obtention de spectres lisses et alignés. Ces étapes ont été réalisées sous Matlab.

Le traitement des spectres FTIR a consisté à calculer la dérivée seconde des spectres. La dérivation d'un spectre permet d'accroître le nombre d'éléments discriminants. Tout d'abord, la dérivée première permet de s'affranchir des problèmes liés à l'acquisition ; elle détermine la pente en chaque point du spectre et renseigne donc sur la façon dont varie l'intensité du spectre en fonction du nombre d'onde. La dérivée seconde correspond au rayon de courbure du spectre et renseigne sur la variabilité de sa pente. Les données spectrales sont alors multipliées par -1 pour obtenir un spectre dans le positif. Ensuite, sur l'ensemble des

spectres, une méthode de normalisation est appliquée : il s'agit de la méthode appelée EMSC pour 'Extended Multiplicated Signal Correction' qui permet de s'affranchir notamment des problèmes de diffusion de la lumière, de variation d'épaisseur de coupe, et corrige la ligne de base.

## 7. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été effectué grâce au logiciel R (R 2.9.2, R Development Core Team, 2008, <http://www.r-project.org/>).

La comparaison des données portant sur les gouttelettes lipidiques obtenues en microscopie optique et présentée par classes d'aire a été réalisée selon le test du Khi deux, de façon à déterminer si la distribution du nombre de gouttelettes était différente entre les deux niveaux de fonte.

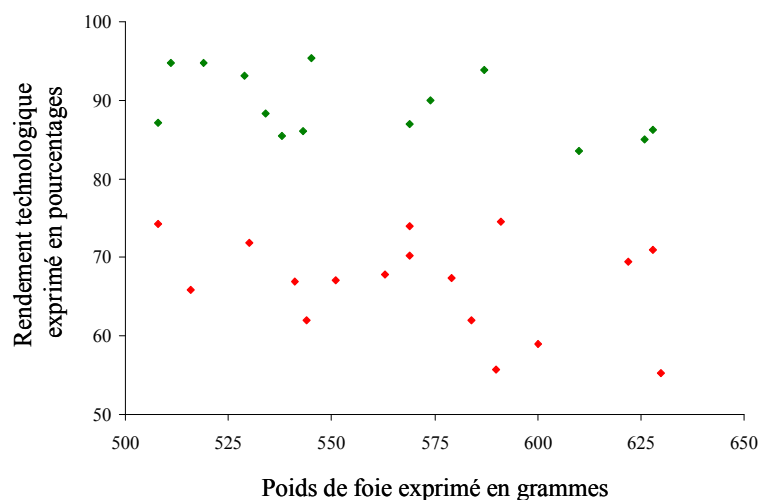
Pour analyser les différences entre les groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' des paramètres zootechniques, physico-chimiques et biochimiques, le test de Student et l'analyse de variance à deux facteurs ont été utilisés après avoir vérifié que les variables étudiées suivaient la loi Normale par le test de Shapiro-Wilk.

Les résultats statistiques sont présentés selon les notations suivantes : NS : non significatif ( $p > 0.05$ ), \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  et \*\*\* :  $p < 0.001$ .

Des analyses en composante principale (ACP) ont été utilisées pour analyser les données acquises en histologie (taux de matrice des coupes à congélation), et les données spectrales FTIR et UV. Elles ont été réalisées grâce au logiciel Unscrambler (CAMO Software).

Les différences d'expression des protéines ont été étudiées grâce à la méthode développée par Meunier *et al.* (2005). Après détermination de l'intensité moyenne des spots, le log du rapport de l'intensité entre les groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' est calculé. Après correction et normalisation des données, seules les valeurs de ratio supérieur à  $\pm 2$  ont été retenues et ont permis de définir les spots d'intérêt.

# *RESULTS*



**Figure 17 :** Représentation graphique selon le poids de foie et le rendement technologique des échantillons sélectionnés dans le cadre du premier volet du projet. Les échantillons appartenant au groupe ‘Fonte faible’ sont représentés en vert, ceux appartenant au groupe ‘Fonte élevée’ en rouge.

**Tableau 4 :** Composition biochimique et caractéristiques technologiques des foies gras constituant le volet 1.

	Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
Effectif	n = 14	n = 17	
Poids de foie, g	559 ± 36	571 ± 39	NS
Rendement technologique, %	89,3 ± 4,0	66,7 ± 5,9	***
Taux de lipides, %	58,4 ± 5,7	58,7 ± 2,4	NS
Taux de MAT, %	7,55 ± 0,66	7,05 ± 0,47	*

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte :

NS :  $p > 0,05$ , \* :  $p < 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.



Ce travail porte sur le déterminisme biologique de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard. Les objectifs sont d'identifier les caractéristiques biologiques qui contribuent à la variabilité de la fonte, et de définir et valider des marqueurs de la fonte lipidique à la cuisson. Pour cela, nous avons adopté une approche intégrée combinant des méthodes de biochimie, de protéomique, d'histologie et de microscopie. Dans cette partie, nous déclinons les résultats des différentes approches.

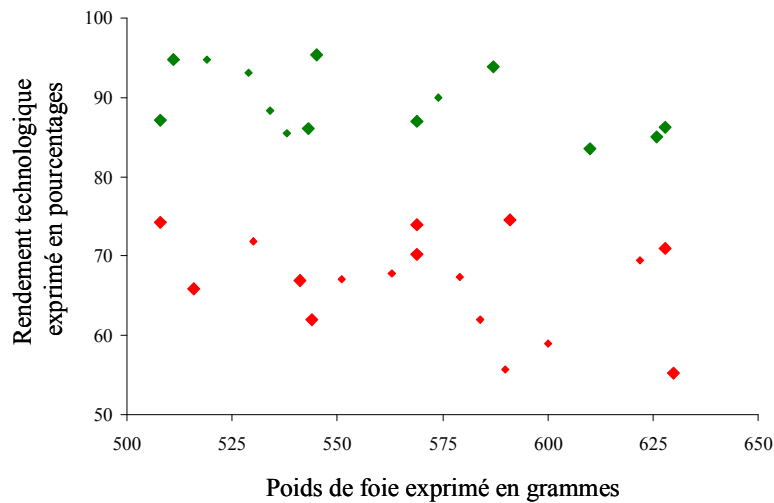
Le poids de foie et le taux d'engraissement sont connus pour influencer le rendement technologique (Rousselot-Pailley *et al.*, 1992). Pour les deux essais qui constituent ce travail, les groupes de comparaison 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' ont donc été créés de sorte à présenter des poids de foie et des taux d'engraissement équivalents, mais des rendements technologiques différents. L'ensemble des résultats est présenté selon la comparaison des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée'. Les différences d'effectifs par groupe, selon les mesures et méthodes employées, sont expliquées dans le paragraphe suivant.

## **1. Echantillonnage**

### **1.1. Premier volet du projet**

Le protocole expérimental du premier volet reposait sur 120 animaux élevés, gavés et abattus à Périgueux (Dordogne). Lors de la pesée des foies gras à l'éviscération, un premier tri avait été effectué de façon à retirer du processus de prélèvement d'échantillons et de transformation les foies les plus légers (d'un poids inférieur à 400 g) et les plus lourds (d'un poids supérieur à 700 g). Parmi les 120 foies gras retenus, 97 avaient été prélevés puis mis en verrine pour cuisson et détermination du rendement technologique. Sur ces foies gras, un second tri a été effectué sur la base du poids de foie, du rendement technologique et du taux d'engraissement. De cette façon, deux groupes de comparaison ont été constitués : 'Fonte faible' correspondant aux échantillons présentant un rendement technologique élevé, et 'Fonte élevée' correspondant aux échantillons présentant un rendement technologique faible.

Le sous-groupe alors constitué comportait 31 foies gras (Figure 17), pour lesquels toutes les mesures biochimiques ont été réalisées : taux de lipides, de matière azotée totale (MAT) et de collagène, ainsi que les mesures d'oxydation des protéines et des lipides. La composition biochimique et les caractéristiques technologiques de ces échantillons sont présentées dans le tableau 4.



**Figure 18 :** Représentation graphique selon le poids de foie et le rendement technologique des échantillons sélectionnés pour l’analyse protéomique du volet 1, et représentés par des pointeurs de plus grande taille : ‘Fonte faible’ (n = 9) vs ‘Fonte élevée (n = 9).

**Tableau 5 :** Composition biochimique et caractéristiques technologiques des groupes de foies gras comparés dans l’analyse protéomique du volet 1 : Groupe ‘Fonte faible’ (n = 9) et Groupe ‘Fonte élevée’ (n = 9)

	Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
Effectif	n = 9	n = 9	
Poids de foie, g	570 ± 44	566 ± 42	NS
Rendement technologique, %	88,8 ± 4,3	68,2 ± 6,1	**
Taux de lipides, %	57,6 ± 2,0	58,6 ± 1,8	NS
Taux de MAT, %	7,6 ± 0,8	7,0 ± 0,5	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte :

NS : p > 0,05, \*\* : p < 0,01.

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.

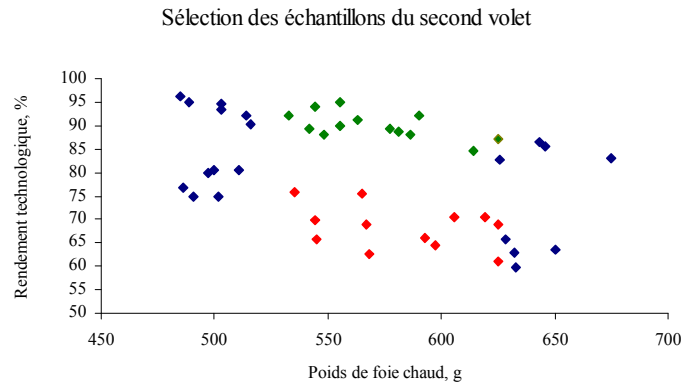
**Tableau 6 :** Composition biochimique et caractéristiques technologiques des groupes de foies gras comparés dans l'analyse histologique du volet 1 : Groupe 'Fonte faible' (n = 6) et Groupe 'Fonte élevée' (n = 4)

	Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
Effectif	n = 6	n = 4	
Poids de foie, g	550 ± 82	640 ± 57	NS
Rendement technologique, %	86,3 ± 2,5	70,6 ± 1,5	***
Taux de lipides, %	60,0 ± 0,8	60,0 ± 4,8	NS
Taux de MAT, %	7,2 ± 0,6	6,4 ± 0,3	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l'effet du niveau de fonte :

NS :  $p > 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.



**Figure 19** : Représentation graphique selon le poids de foie et le rendement technologique des échantillons sélectionnés dans le cadre du second volet du projet. Pour les analyses protéomique et histologique, les échantillons constituant le groupe ‘Fonte faible’ sont représentés en vert, et ceux du groupe ‘Fonte élevée’ en rouge.

**Tableau 7** : Composition biochimique et caractéristiques technologiques des échantillons de protéomique, histologie et profils en lipides neutres et en triglycérides du volet 2 : Groupe ‘Fonte faible’ et Groupe ‘Fonte élevée’.

	Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
Effectif	n = 13	n = 12	
Poids de foie chaud, g	570 ± 27	582 ± 31	NS
Rendement technologique, %	89,9 ± 2,7	68,3 ± 4,4	**
Taux de lipides, %	55,8 ± 3,0	56,2 ± 5,4	NS
Taux de MAT, %	7,55 ± 0,56	7,05 ± 0,47	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte :

NS :  $p > 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.

Les analyses protéomiques ont été réalisées sur un sous échantillonnage des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée'. Nous avons sélectionné des foies gras présentant des rendements technologiques différents mais constituants des bandes de poids équivalents : sur la figure 18, les échantillons du groupe 'Fonte faible' (n = 9) sont représentés en vert, et ceux du groupe 'Fonte élevée' (n = 9) en rouge.

La composition biochimique et les caractéristiques technologiques des foies de l'analyse protéomique sont présentées dans le tableau 5.

Un échantillonnage de 10 individus a été sélectionné pour conduire les analyses histologiques. La composition biochimique et les caractéristiques technologiques des deux groupes constitués sont listées dans le tableau 6.

## 1.2. Second volet du projet

Le protocole expérimental du second volet reposait sur 160 animaux élevés, gavés et abattus à Périgueux. Parmi les 160 foies gras, deux ont été retirés du procédé de transformation : un pour des raisons de défaut d'aspect, et le second car son poids était trop faible (309 grammes) pour permettre à la fois de réaliser l'ensemble des prélèvements et la mise en verrine. De plus, la limite inférieure de poids pour un foie gras de canard est de 300 grammes. En deçà, du point de vue de la réglementation, l'appellation 'foie gras' ne s'applique pas. Ce sont donc 158 foies gras qui ont été mis en verrine pour cuisson et calcul du rendement technologique. De la même manière que pour le premier volet, un tri a été réalisé sur la base du poids de foie, du rendement technologique et du taux d'engraissement. Le sous-groupe alors constitué comportait 45 foies gras (Figure 19), pour lesquels toutes les mesures biochimiques ont été réalisées : taux de lipides, de MAT, mesures de l'oxydation des protéines et des lipides.

De façon à obtenir des résultats comparables à ceux du volet 1, nous avons choisi de réaliser les analyses protéomique et histologique, ainsi que les profils en lipides sur la gamme de poids intermédiaire : celle comprise entre 525 et 625 grammes qui est la plus proche de la gamme de poids utilisée en industrie pour la transformation de foies gras entiers. La composition biochimique et les caractéristiques technologiques de ces deux groupes sont présentées dans le tableau 7.

**Tableau 8** : Paramètres zootechniques des animaux des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’.

		Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
Effectif		n = 14	n = 17	
Volet 1	Poids des animaux avant gavage, g	4339 ± 329	4269 ± 286	NS
	Poids des animaux après gavage, g	6304 ± 351	6060 ± 303	NS
	Poids de foie, g	559 ± 40	571 ± 36	NS
Effectif		n = 13	n = 12	
Volet 2	Poids après gavage, g	6281 ± 258	6198 ± 320	NS
	Poids de foie, g	582 ± 31	570 ± 27	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte : NS :  $p > 0,05$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.

**Tableau 9** : Paramètres technologiques des animaux des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’.

		Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
Effectif		n = 14	n = 17	
Volet 1	Rendement technologique, %	89,3 ± 4,0	66,7 ± 5,9	***
	Classification	Extra : 3 / 14	Extra : 3 / 17	
		Sélection : 11 / 14 Tout venant : 0 / 14	Sélection : 13 / 17 Tout venant : 1 / 17	NS
Effectif		n = 13	n = 12	
Volet 2	Rendement technologique, %	89,9 ± 2,7	68,3 ± 4,4	***
	Classification	Extra : 6 / 13	Extra : 5 / 12	
		Sélection : 5 / 13 Tout venant : 2 / 13	Sélection : 7 / 12 Tout venant : 0 / 12	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte :

NS :  $p > 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Les résultats de rendement technologique sont présentés en moyenne ± écart-type, ceux de la classification sont présentés selon le rapport au nombre total d’échantillons. Les différences de rendement technologique sont évaluées par un test de Student, et les différences de distribution des foies gras selon la classification sont évaluées par un test de Khi deux.

## 2. Paramètres zootechniques

Au cours du premier volet, les animaux ont été identifiés à leur entrée en gavage, ce qui a permis d'obtenir des données de poids des animaux avant et après le gavage. Dans le second volet, cela n'a pas été possible ; seules les données de poids des animaux à l'abattage et de poids de foie sont disponibles.

Les paramètres zootechniques sont présentés dans le tableau 8. Les animaux sont pesés sur le quai de déchargement de l'abattoir, soit après 10 heures de jeûne. Le foie est pesé immédiatement après l'éviscération, soit à 20 minutes *post mortem*.

Dans les deux volets, après sélection sur le niveau de fonte, on constate que les animaux des deux groupes présentaient des poids équivalents avant (pour le premier volet) et après gavage.

## 3. Paramètres technologiques

Les paramètres technologiques visent à évaluer les qualités des foies gras du point de vue du transformateur. Il s'agit tout d'abord du rendement technologique, mesure directe de la fonte lipidique à la cuisson du foie entier par l'évaluation de la graisse exsudée superficielle. La classification commerciale a pour but d'orienter les foies gras vers un type de transformation, tel que le foie gras entier par exemple, qui est la meilleure valorisation pour la filière. La classification est réalisée par une personne entraînée qui juge la qualité des foies gras refroidis en termes de texture et d'éventuels défauts d'aspects (voir Matériels et Méthodes, § 1.4). La classe 'Extra' correspond à la meilleure notation, puis les plus gros foies ou ceux présentant des défauts sont classés en 'Sélection' ou 'Tout venant' par ordre décroissant de qualité. Le tableau 9 présente les résultats des données technologiques correspondant aux volets 1 et 2.

Conformément aux critères de constitution des groupes de comparaison, le rendement technologique est significativement différent entre les deux lots. En revanche, quel que soit le volet, la classification commerciale n'est pas liée au rendement technologique, et n'a donc pas permis de « prédire » correctement la fonte lipidique à la cuisson.

**Tableau 10** : Données physico-chimiques des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’.

		Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
	Effectif	n = 14	n = 17	
Volet 1	pH à 20 minutes <i>post mortem</i>	5,93 ± 0,06	5,84 ± 0,13	*
	Température à 20 minutes <i>post mortem</i> , °C	41,4 ± 0,9	41,2 ± 0,8	NS
	pH après refroidissement	6,05 ± 0,18	6,04 ± 0,15	NS
	Température après refroidissement, °C	3,4 ± 1,22	3,6 ± 1,1	NS
	Effectif	n = 13	n = 12	
Volet 2	pH à 20 minutes <i>post mortem</i>	5,90 ± 0,09	5,84 ± 0,10	NS
	Température à 20 minutes <i>post mortem</i> , °C	41,1 ± 1,4	41,0 ± 1,6	NS
	pH après refroidissement	5,83 ± 0,11	5,78 ± 0,09	NS
	Température après refroidissement, °C	4,1 ± 0,8	4,4 ± 1,2	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte :

NS :  $p > 0,05$ , \* :  $p < 0,05$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.

**Tableau 11** : Caractérisation biochimique des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’.

		Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques
	Effectif	n = 14	n = 17	
Volet 1	Taux de matière sèche, %	69,8 ± 1,7	71,5 ± 1,7	**
	Taux de lipides, %	57,8 ± 3,9	58,7 ± 2,4	NS
	Taux de MAT, %	7,55 ± 0,66	7,05 ± 0,47	NS
	Taux de collagène, %	1,35 ± 0,25	1,50 ± 0,29	NS
	Effectif	n = 13	n = 12	
Volet 2	Taux de matière sèche, %	67,7 ± 1,0	68,9 ± 2,1	NS
	Taux de lipides, %	55,8 ± 3,0	56,2 ± 5,4	NS
	Taux de MAT, %	7,92 ± 0,63	7,10 ± 0,63	*

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte :

\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , NS :  $p > 0,05$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.



## 4. Caractérisations physico-chimique et biochimique

Les caractérisations physico-chimique et biochimique des foies gras reposent sur la mesure des paramètres de pH et de température, la détermination de la teneur des principaux constituants, la mesure du statut oxydant des protéines et des lipides et enfin les profils en lipides neutres et en triglycérides.

### 4.1. Caractéristiques physico-chimiques

Nous avons mesuré la température à cœur du foie gras ainsi que le pH selon la méthode décrite par Jeacocke (1977), dans un premier temps avant refroidissement, à 20 minutes *post mortem*, et dans un second temps après 6 heures de refroidissement. Les données des volets 1 et 2 sont présentées dans le tableau 10.

Dans le premier volet, les foies gras du groupe 'Fonte faible' présentaient une valeur de pH à 20 minutes *post mortem* légèrement supérieure ( $p < 0,05$ ) à ceux du groupe 'Fonte élevée'. Ce résultat n'a pas été confirmé au cours du second volet.

La température à cœur des foies est équivalente entre les niveaux de fonte, dans les deux volets. La réfrigération de 6 heures a pour but d'obtenir une température à cœur du produit d'environ 4°C, ce qui est confirmé par ces résultats.

### 4.2. Composition biochimique

La caractérisation biochimique des foies gras des deux volets comportait les mesures des taux de matière sèche, de lipides et de protéines (Tableau 11). Dans le premier volet, nous avons mesuré le taux de collagène. Ce dosage est lourd et fastidieux à réaliser. Dans la mesure où il n'a pas permis de mettre en évidence de lien avec la fonte lipidique à la cuisson, il n'a pas été reconduit dans le second volet.

Dans le premier volet, le taux de matière sèche est supérieur ( $p = 0,005$ ) dans les foies gras du groupe 'Fonte élevée' par rapport au groupe 'Fonte faible'. Ce résultat n'est pas confirmé par le taux de lipides, en effet les groupes sont constitués de telle sorte que les taux d'engraissement soient équivalents. Une légère différence de taux de protéines a été trouvée dans le second volet en termes de teneur en protéines en faveur du groupe 'Fonte faible' ( $p = 0,03$ ).

**Tableau 12** : Mesure du statut oxydant des protéines et lipides des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’.

		Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
Effectif		n = 14	n = 17	
Volet 1	Oxydation des protéines en nmoles de DNPH / mg de protéines	5,54 ± 0,86	5,35 ± 0,72	NS
	Oxydation des lipides en nmoles équivalent MDA / mg de foie gras	2,14 ± 0,79	2,03 ± 1,03	NS
Effectif		n = 13	n = 12	
Volet 2	Oxydation des protéines en nmoles de DNPH / mg de protéines	5,93 ± 1,42	5,61 ± 0,51	NS
	Oxydation des lipides en nmoles équivalent MDA / mg de foie gras	2,84 ± 0,98	2,57 ± 0,90	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte : NS :  $p > 0,05$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.

**Tableau 13** : Mesure de la teneur en glycogène et en acide lactique des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’.

		Fonte faible		Fonte élevée		Statistiques <sup>1</sup>		
		20 minutes <i>post mortem</i>	6 heures <i>post mortem</i>	20 minutes <i>post mortem</i>	6 heures <i>post mortem</i>	Fonte	Temps	Fonte x Temps
Effectif		n = 14		n = 17				
Volet 1	Acide lactique		7,6 ± 4,0		8,2 ± 0,9	NS		
	Glycogène		84,3 ± 28,5 <sup>a</sup>		47,3 ± 22,0 <sup>b</sup>	***		
Effectif		n = 13		n = 12				
Volet 2	Acide lactique	8,6 ± 1,1	9,1 ± 1,2	8,9 ± 1,4	9,5 ± 1,4	NS	NS	NS
	Glycogène	117,8 ± 21,7 <sup>a</sup>	91,4 ± 9,3 <sup>b</sup>	103,1 ± 17,9 <sup>a</sup>	94,6 ± 10,8 <sup>b</sup>	NS	***	NS

\* Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte, de l’effet du temps *post mortem* et de leur interaction : NS :  $p > 0,05$ , \* :  $p < 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Dans une même ligne, des lettres différentes indiquent une différence significative au seuil de  $p=0.05$ . Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type, et sont exprimés en  $\mu$ mole par gramme de foie gras.

### 4.3. Mesure du statut oxydant

L'oxydation des protéines est évaluée par la détection des composés carbonyles, et l'oxydation des lipides par la mesure des substances TBARS. Les résultats des volets 1 et 2 sont présentés dans le tableau 12.

Les résultats ne permettent pas d'établir de lien significatif entre la fonte lipidique à la cuisson et le statut oxydant des protéines ou des lipides.

### 4.4. Mesure de la teneur en glycogène et en acide lactique

Les teneurs en glycogène et en acide lactique ont été mesurées à partir des échantillons de foies gras crus prélevés à 6 heures *post mortem* dans le volet 1, et prélevés à 20 minutes et 6 heures *post mortem* dans le volet 2. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Dans le premier volet du projet, nous avons mis en évidence une teneur en glycogène supérieure dans les échantillons du groupe 'Fonte faible'. Il s'agissait de mesures réalisées sur des prélèvements à 6 heures *post mortem*.

Dans le cadre du second volet du projet, de sorte à affiner l'évolution de la teneur de ces métabolites *post mortem*, nous avons réalisé les mesures à 20 minutes et à 6 heures *post mortem*. D'une part, les résultats du premier volet ne sont pas confirmés ; les teneurs en glycogène et en acide lactique sont équivalentes entre niveaux de fonte lipidique à la cuisson, quel que soit le temps de prélèvement. D'autre part, les résultats indiquent une diminution des teneurs en glycogène entre 20 minutes et 6 heures *post mortem*, quel que soit le niveau de fonte lipidique.

## **5. Analyse des profils en lipides neutres et en triglycérides**

Le foie gras est principalement constitué de lipides, et tout particulièrement de triglycérides. Dans un premier temps, nous avons réalisé le profil en lipides neutres pour déterminer si la fonte lipidique à la cuisson était liée à un type de lipides neutres en particulier. De la même façon, nous avons réalisé les profils en triglycérides selon les acides

**Tableau 14** : Profil en lipides neutres des échantillons des deux volets du projet, présentés selon la comparaison des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’.

		Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
	Effectif	n = 14	n = 17	
Volet 1	Lipides totaux, %	57,7 ± 3,9	58,7 ± 2,3	NS
	Acides gras libres	0,54 ± 0,16	0,51 ± 0,12	NS
	Cholestérol	<b>0,44 ± 0,02</b>	<b>0,42 ± 0,02</b>	*
	Monoglycérides	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,03	NS
	Diglycérides	0,25 ± 0,20	0,34 ± 0,16	NS
	Triglycérides	98,50 ± 0,54	98,60 ± 0,71	NS
	Esters de cholestérol	0,88 ± 0,09	0,88 ± 0,09	NS
	Effectif	n = 13	n = 12	
Volet 2	Lipides totaux, %	55,8 ± 3,0	56,2 ± 5,4	NS
	Acides gras libres	0,76 ± 0,09	0,77 ± 0,13	NS
	Cholestérol	0,57 ± 0,02	0,56 ± 0,02	NS
	Monoglycérides	0,25 ± 0,04	0,20 ± 0,10	NS
	Diglycérides	0,63 ± 0,19	0,66 ± 0,15	NS
	Triglycérides	98,04 ± 0,53	98,12 ± 0,25	NS
	Esters de cholestérol	0,92 ± 0,12	0,99 ± 0,16	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte :

NS :  $p > 0,05$ , \* :  $p < 0,05$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type et sont exprimés en pourcentage de la teneur en lipides totaux.

**Tableau 15** : Profil en triglycérides des échantillons du premier volet du projet.

	Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques <sup>1</sup>
Effectif	n = 14	n = 17	
Lipides totaux	57,7 ± 3,9	58,7 ± 2,3	NS
linoleyl 1, di-oleyl 2,3, glycerol (LOO)	2,87 ± 0,29	2,83 ± 0,34	NS
palmitoleyl 1, di-oleyl 2,3, glycerol (PoOO)	<b>4,36 ± 0,50</b>	<b>4,04 ± 0,25</b>	*
palmityl 1, oleyl 2, linoleyl 3, glycerol (POL)	5,86 ± 0,56	5,79 ± 0,69	NS
di-palmityl 1,2, linoleyl 3, glycerol (PPL)	8,30 ± 0,62	8,15 ± 0,80	NS
trioléine (OOO)	8,79 ± 0,74	8,67 ± 0,95	NS
palmityl 1, di-oleyl 2,3, glycerol (POO)	28,39 ± 1,38	29,41 ± 2,66	NS
palmityl 1,3, oleyl 2, glycerol (POP)	7,07 ± 0,66	7,30 ± 0,85	NS
tripalmitine (PPP)	3,19 ± 0,23	3,19 ± 0,24	NS
stearyl 1, di-oleyl 2,3, glycerol (SOO)	12,17 ± 1,01	11,68 ± 0,94	NS
palmityl 1, oleyl 2, stearyl 3, glycerol (POS)	12,42 ± 0,83	12,56 ± 1,00	NS
di-palmityl 1,2, stearyl 3, glycerol (PPS)	2,34 ± 0,45	2,45 ± 0,57	NS
palmityl 1, di-stearyl 2,3, glycerol (PSS) / palmityl 2, di-stearyl 1,3, glycerol (SPS)	5,58 ± 0,46	4,03 ± 0,58	NS

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l'effet du niveau de fonte :

NS :  $p > 0,05$ , \* :  $p < 0,05$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type et sont exprimés en pourcentage de la teneur en triglycérides totaux.

gras qui estérifient le glycérol, avec comme objectif de déterminer si la fonte à la cuisson était liée à un type particulier de triglycérides, notamment en termes de degré d'insaturation.

### 5.1. Profils en lipides neutres

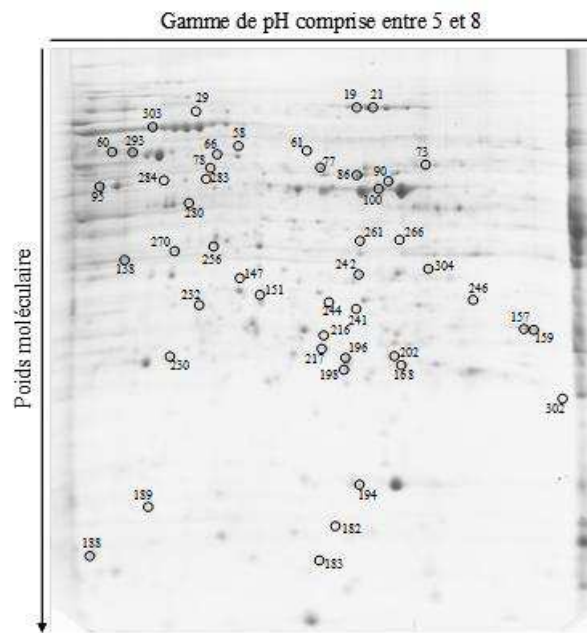
Les profils en lipides neutres sont obtenus à partir de l'extrait à froid des lipides totaux du foie gras cru selon la méthode de Folch *et al.* (1957), par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Ces profils permettent la séparation et l'analyse des acides gras libres, du cholestérol, des monoglycérides (MG), des diglycérides (DG), des triglycérides (TG) et des esters de cholestérol. Les résultats des profils des foies gras obtenus dans le cadre des deux volets sont présentés dans le tableau 14.

La très grande majorité des lipides neutres est constituée par les triglycérides (plus de 98%). La première expérimentation a permis de mettre en évidence une légère différence de teneur en cholestérol en faveur des foies gras présentant un niveau de fonte à la cuisson faible. En revanche, pour l'ensemble des autres composés, les teneurs sont équivalentes entre les deux groupes. Au cours du second volet, l'ensemble des composés constituant le profil en lipides neutres montrait des teneurs équivalentes entre les niveaux de fonte. Le résultat concernant le cholestérol n'a pas été confirmé.

### 5.2. Profils en triglycérides

La classe des triglycérides constitue la très grande majorité des lipides, plus de 98 % dans notre étude. Afin d'affiner l'information portée par cette classe de lipides, notamment sur la caractérisation des acides gras en termes de nombre d'atomes de carbone et de degré d'insaturation, le profil en triglycérides a été réalisé. Les profils en triglycérides sont obtenus à partir de l'extrait à froid des lipides totaux du foie gras cru selon la méthode de Folch *et al.* (1957), par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Ils permettent la séparation et l'analyse de triglycérides listés dans le tableau 15.

Les principaux triglycérides du foie gras cru sont le palmityl 1, di-oleyl 2,3 glycerol (POO), le palmityl 1, oleyl 2, stearyl 3 glycerol (POS) et le stearyl 1, di-oleyl 2,3 glycerol (SOO). Parmi les 12 composés séparés et analysés, seul le palmitoleyl 1, di-oleyl 2,3, glycerol (PoOO) présente une teneur supérieure dans le groupe des foies gras présentant un niveau de fonte faible, mais cette différence représente seulement 0.3 % des triglycérides.



**Figure 20 :** Exemple de gel d'électrophorèse bidimensionnelle de foie gras cru du groupe 'Fonte élevée', prélevé à 20 minutes *post mortem*. Les protéines sont séparées sur un gradient de pH d'une gamme comprise entre 5 et 8 en première dimension, puis sur gel SDS-PAGE avec une concentration en acrylamide de 12%. Les spots entourés et identifiés par leur numéro de détection sont ceux dont l'expression à 20 minutes *post mortem* a été reliée à la fonte lipidique à la cuisson.

## 6. Etude de l'expression différentielle des protéines par analyse protéomique

L'expression différentielle des protéines a été étudiée dans deux fractions protéiques différentes. Dans un premier temps, nous avons extrait les protéines selon leurs propriétés de solubilité. Ensuite, nous avons adapté les méthodes de 'séparation - identification' à chacune de ces fractions. La fraction protéique soluble à faible force ionique a été étudiée par électrophorèse bidimensionnelle et les spots d'intérêt identifiés par spectrométrie de masse. La fraction protéique non soluble à faible force ionique a été étudiée selon la stratégie 'shot-gun' avec électrophorèse mono dimensionnelle suivie de l'identification de l'ensemble des protéines par spectrométrie de masse.

L'analyse des données comportait deux parties. Tout d'abord, nous avons mis en lien la fonte lipidique à la cuisson avec l'expression des protéines à 20 minutes *post mortem*, en émettant l'hypothèse qu'à ce stade, le profil d'expression était très proche de celui que l'on pourrait observer *in vivo*. Puis, nous avons relié la fonte lipidique à la cuisson avec l'évolution de l'expression des protéines au cours du refroidissement, en comparant les profils protéiques obtenus à 20 minutes et à 6 heures *post mortem* au sein de chaque groupe de fonte. L'objectif était de vérifier si l'évolution du tissu après la mort de l'animal différait et impliquait un niveau de fonte différent, par analogie aux phénomènes observés dans les produits carnés. Ainsi, de nombreuses études ont porté sur le lien entre le métabolisme *post mortem* et les qualités technologiques des viandes (pour revue : Morzel *et al.*, 2006 b).

### 6.1. Analyse de la fraction protéique soluble à faible force ionique

L'analyse de la fraction protéique soluble à faible force ionique (FS) a été conduite par électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse pour l'identification des spots d'intérêt. Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle ont été réalisés sur les échantillons des groupes 'Fonte faible' (n = 9) et 'Fonte élevée' (n = 9), aux deux temps *post mortem* : avant et après réfrigération. Un exemple de gel est présenté dans la figure 20, il s'agit d'un gel d'électrophorèse bidimensionnelle obtenu à partir d'un extrait protéique de foie gras cru du groupe 'Fonte élevée' prélevé à 20 minutes *post mortem*.



**Tableau 16** : Protéines identifiées dans la fraction protéique soluble à faible force ionique des foies gras, dont l'expression à 20 minutes *post mortem* varie en fonction de la fonte lipidique à la cuisson (Fonte élevée : n = 9, Fonte faible : n = 9) (moyenne ± écart-type).

Référence de la séquence <sup>a</sup>	Numéro de spot	Fonte faible	Fonte élevée	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	Score Mascot <sup>b</sup>	Recouvrement de la séquence <sup>c</sup>	Nb de peptides matchés <sup>d</sup>	PM Th kDa <sup>e</sup>	pI Th <sup>e</sup>
<b>Métabolisme</b>									
FTNGVNY03F0Z2Y.s.ap.2	302	1,15 ± 0,53	ND	Triosephosphate isomérase - <i>Anas platyrhynchos</i>	108	37%	14	43668	8,77
M20749.s.ap.2	100	0,20 ± 0,21	ND	Alpha émolase 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	110	36%	17	61834	8,42
FTNGVNY03F0BE0.s.ap.2	138	0,52 ± 0,55	ND	Malate déshydrogénase 'cytoplasmic-like' - <i>Anas platyrhynchos</i>	75	15%	8	58602	8,85
DQ358123.s.ap.2	304	ND	0,36 ± 0,59	Fatty acid binding protéin 4 - <i>Anas platyrhynchos</i>	120	44%	15	23747	8,5
<b>Processus d'oxydo-reduction</b>									
gij118093103	196	0,56 ± 0,32	0,34 ± 0,19	Protéine Prdx3 - <i>Gallus gallus</i>	155	8%	2	30972	8,4
gij118093103	168	0,10 ± 0,03	0,28 ± 0,10	Protéine Prdx3 - <i>Gallus gallus</i>	77	8%	2	30972	8,4
F3T72ZM05F2QQ6.s.ap.2	194	0,12 ± 0,03	0,66 ± 0,27	Superoxide dismutase 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	68	32%	6	32279	8,52
gij224071287	86	0,34 ± 0,06	1,58 ± 0,75	Aldéhyde déshydrogénase 2 - <i>Taeniopygia guttata</i>	181	11%	5	56746	6,68
<b>Homéostasie calcique</b>									
FTNGVNY03GIR1X.s.ap.2	256	0,14 ± 0,20	ND	Regucalcine - <i>Anas platyrhynchos</i>	93	34%	13	43725	8,18
<b>Activité protéolytique</b>									
gij259835	188	0,26 ± 0,25	ND	Prepro-cathepsine D - <i>Gallus gallus</i>	112	8%	2	43270	5,9
<b>Synthèse d'ATP</b>									
FTNGVNY03F3RUW.s.ap.2	95	0,31 ± 0,18	ND	ATP synthase sous-unité beta - <i>Anas platyrhynchos</i>	143	47%	21	54441	5,11
<b>Diverses protéines</b>									
gij7658009	182	0,32 ± 0,34	0,21 ± 0,12	Protéine kinase C inhibitor - <i>Anas platyrhynchos</i>	70	60%	6	13697	6,04
GIDS3QQ02DOEUG.s.ap.2	242	0,12 ± 0,04	0,44 ± 0,39	Agmatinase - <i>Anas platyrhynchos</i>	77	20%	9	42733	8,65

<sup>a</sup> Le nom des protéines et la référence des séquences sont issues des bases de données Swiss-Prot et EST. <sup>b</sup> Le seuil de significativité du score MASCOT est 67. <sup>c</sup> Recouvrement de la séquence exprimé en pourcentage de la séquence entière en acides aminés. <sup>d</sup> Nombre de peptides matchés lors de la recherche dans les bases de données. <sup>e</sup> Poids moléculaire (en kDa) et point isoélectrique théoriques (issus des bases de données UniProtKB/Swiss-Prot pour la partie MALDI-TOF et NCBI 'mammalian taxonomy' pour la partie LC-MS/MS). <sup>f</sup> La prepro cathepsine D (spot 188), la protéine Prdx3 (spots 168 and 196), la superoxide dismutase 1 (spot 194) et l'aldéhyde déshydrogénase 2 (spot 86) ont été identifiées par LC-MS/MS.

### 6.1.1. Expression différentielle des protéines du foie gras au moment de l'éviscération

La comparaison des cartes protéomiques des foies gras des deux groupes de fonte à 20 minutes *post mortem* par analyse d'images des gels a permis la détection de 187 spots, dont 47 présentaient des expressions différentes selon le niveau de fonte à la cuisson. Parmi eux, 8 spots étaient surexprimés dans le groupe 'Fonte élevée' et 4 étaient surexprimés dans le groupe 'Fonte faible'. Un spot a été détecté uniquement dans le groupe 'Fonte élevée' et 34 spots ont été détectés uniquement dans le groupe 'Fonte faible'. La spectrométrie de masse – MALDI-TOF et LC-MS/MS – a permis l'identification de 13 protéines parmi les 47 spots d'intérêt. Les séquences protéiques ont été identifiées par comparaison avec les banques de données *Gallus gallus* et *Anas platyrhynchos*.

Les 13 protéines identifiées peuvent être classées selon leurs fonctions biologiques (Tableau 16) : quatre ont un rôle dans le métabolisme énergétique, quatre sont impliquées dans le stress cellulaire oxydatif, une joue un rôle dans l'homéostasie calcique, une a une activité protéolytique, une prend part à la synthèse d'ATP et deux sont des protéines aux fonctions diverses.

#### **Métabolisme.**

La triosephosphate isomérase (spot 302), l'alpha-énolase (spot 100) et la malate déshydrogénase (spot 138) ont été détectées seulement dans la fraction protéique soluble des foies gras du groupe 'Fonte faible', alors que la 'fatty acid binding protein' 4 (spot 304) a été détectée seulement dans la fraction protéique soluble des foies gras du groupe 'Fonte élevée'. La triosephosphate isomérase et l'alpha-énolase sont des enzymes glycolytiques, responsables respectivement des cinquième et neuvième étapes de la glycolyse. La malate déshydrogénase est une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse la conversion réversible du malate en oxaloacétate, utilisant du  $\text{NAD}^+$ . Cette enzyme est également impliquée dans la néoglucogénèse. La 'fatty acid binding protein' 4 est impliquée dans le transport des lipides, et donc indirectement dans le métabolisme lipidique.

### **Processus d'oxydo-réduction.**

Parmi les quatre spots impliqués dans des processus d'oxydo-réduction, un présentait une surexpression dans le groupe 'Fonte faible' et a été identifié comme étant la peroxiredoxin protein III (Prdx3) (spot 196). Les trois protéines surexprimées dans le groupe 'Fonte élevée' sont la Prdx3 (spot 168), la superoxide dismutase 1 (SOD1) (spot 194) et l'aldéhyde déshydrogénase 2 (spot 86). La protéine SOD1 catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. La Prdx3 et l'aldéhyde déshydrogénase 2 sont impliquées dans la régulation du statut oxydant des cellules.

### **Homéostasie calcique.**

La régucalcine (spot 256) a été détectée seulement dans les foies gras du groupe 'Fonte faible'. Il s'agit d'une protéine fixant le calcium qui joue de multiples rôles dans les cellules hépatiques.

### **Activité protéolytique.**

La prepro cathepsine D (spot 188) a été détectée uniquement dans les foies gras du groupe 'Fonte faible'. La prepro cathepsine D est la forme inactive de la cathepsine D qui est une protéase aspartique lysosomale impliquée dans la dégradation des protéines.

### **Synthèse d'ATP.**

L'ATP synthase sous-unité beta (spot 95) a été détectée uniquement dans la fraction protéique soluble des foies gras présentant un niveau de fonte faible. L'ATP synthase est une protéine membranaire permettant la synthèse d'ATP en présence d'un gradient de protons, d'ADP et de phosphate.

### **Protéines aux fonctions diverses.**

La protéine identifiée comme étant une protéine kinase C inhibitor (spot 182) présentait une surexpression dans le groupe 'Fonte faible'. L'agmatinase (spot 242) présentait une intensité supérieure dans les foies gras du groupe 'Fonte élevée'. L'agmatinase permet la réaction d'hydrolyse de l'agmatine en putrescine et urée.

**Tableau 17** : Protéines identifiées dans la fraction protéique soluble à faible force ionique des foies gras, dont l'expression évolue entre 20 minutes et 6 heures *post mortem* dans le groupe 'Fonte faible' (n = 9) (moyenne ± écart-type).

Référence de la séquence	Numéro de spot	Fonte faible	Fonte élevée	Nom de la protéine - Taxonomie	Score Mascot	Recouvrement de la séquence	Nb de peptides matchés	PM Th kDa	pI Th
<b>Processus d'oxydo-réduction</b>									
FTNGVNY03F2GR4.s.ap.2	85	1,46 ± 0,66	ND	Aldehyde dehydrogenase 2 family - <i>Anas platyrhynchos</i>	106	30%	18	70283	8,96
FTNGVNY03F2GR4.s.ap.2	79	0,57 ± 0,23	ND	Aldehyde dehydrogenase 2 family - <i>Anas platyrhynchos</i>	75	16%	9	70283	8,96
gij224071287	86	0,17 ± 0,18	ND	Aldehyde dehydrogenase 2 family - <i>Taeniopygia guttata</i>	181	11%	5	56746	6,68
F3T72ZM05F2QQ6.s.ap.2	194	0,06 ± 0,06	ND	Superoxide dismutase 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	68	32%	6	32279	8,52
<b>Métabolisme</b>									
M20749.s.ap.2	101	0,61 ± 0,57	0,33 ± 0,27	Enolase 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	101	32%	16	61834	8,42
M20749.s.ap.2	100	0,31 ± 0,18	0,40 ± 0,48	Enolase 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	110	36%	17	61834	8,42
FTNGVNY03F0Z2Y.s.ap.2	211	0,16 ± 0,19	0,51 ± 0,97	Triosephosphate isomerase 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	82	27%	8	43668	8,77
DQ358123.s.ap.2	304	N	0,10 ± 0,09	Fatty acid binding protein 4 - <i>Anas platyrhynchos</i>	120	44%	15	23747	8,5
<b>Activité protéolytique</b>									
gij259835	188	0,26 ± 0,25	0,05 ± 0,06	Prepro-cathepsin D - <i>Gallus gallus</i>	112	8%	2	43270	5,9
gij259835	234	0,08 ± 0,10	0,02 ± 0,03	Prepro-cathepsin D - <i>Gallus gallus</i>	88	10%	3	43270	5,9
gij45384002	222	0,36 ± 0,42	0,10 ± 0,14	Cathepsin D precursor - <i>Gallus gallus</i>	65	17%	6	43270	5,9
<b>Chaperone</b>									
FTNGVNY03F03OW.s.ap.2	41	1,16 ± 0,77	ND	Heat shock protein 70B - <i>Anas platyrhynchos</i>	88	17%	8	84166	6,72
<b>Diverses protéines</b>									
FTNGVNY03F3RUW.s.ap.2	95	0,31 ± 0,18	ND	ATP synthase subunit beta - <i>Anas platyrhynchos</i>	143	47%	21	54441	5,11
gij7658009	182	0,24 ± 0,32	0,06 ± 0,04	Protein kinase C inhibitor - <i>Anas platyrhynchos</i>	70	60%	6	13697	6,04
FTNGVNY03GIR1X.s.ap.2	256	0,40 ± 0,38	0,14 ± 0,20	Regucalcin - <i>Anas platyrhynchos</i>	93	34%	13	43725	8,18

<sup>a</sup> Le nom des protéines et la référence des séquences sont issues des bases de données Swiss-Prot et EST. <sup>b</sup> Le seuil de significativité du score MASCOT est 67. <sup>c</sup> Recouvrement de la séquence exprimé en pourcentage de la séquence entière en acides aminés. <sup>d</sup> Nombre de peptides matchés lors de la recherche dans les bases de données. <sup>e</sup> Poids moléculaire (en kDa) et point isoélectrique théoriques (issus des bases de données UniProtKB/Swiss-Prot pour la partie MALDI-TOF et NCBI 'mammalian taxonomy' pour la partie LC-MS/MS). <sup>f</sup> L'aldéhyde déshydrogénase 2 family D (spots 79 et 86), la superoxide dismutase 1 (spot 194) la prepro-cathepsine D (spots 188 et 234) et la cathepsine D precursor (spot 222) ont été identifiées par LC-MS/MS.

### 6.1.2. Expression des protéines du foie gras au cours du refroidissement

De façon à relier la fonte lipidique à la cuisson à l'évolution de l'expression des protéines au cours du refroidissement, nous avons comparé les profils protéiques au sein de chaque groupe de fonte à la cuisson, avant et après refroidissement (20 minutes et 6 heures *post mortem*).

Dans le groupe des foies gras présentant un niveau de fonte faible à la cuisson, la comparaison des cartes protéomiques à 20 minutes et à 6 heures *post mortem* a permis la détection de 187 spots, dont 36 spots montrent une intensité en évolution. Parmi eux, dix spots étaient surexprimés et quatre sous-exprimés à 20 minutes *post mortem* par rapport à 6 heures *post mortem*. Puis, 21 spots ont été détectés seulement à 20 minutes *post mortem* et un a été détecté seulement à 6 heures *post mortem*.

Globalement, les résultats indiquaient une diminution de l'expression des protéines après refroidissement des foies gras.

La spectrométrie de masse – MALDI-TOF et LC-MS/MS – a permis l'identification de 15 protéines parmi les 36 spots d'intérêt. Les séquences protéiques ont été identifiées par comparaison avec les banques de données *Gallus gallus* et *Anas platyrhynchos*.

Les 15 protéines identifiées peuvent être classées selon leurs fonctions biologiques (Tableau 17) : quatre sont impliquées dans le stress cellulaire oxydatif, quatre ont des activités métaboliques, trois ont des activités protéolytiques, une a une activité de chaperone et trois sont des protéines aux fonctions diverses.

Dans le groupe des foies gras présentant un niveau de fonte élevé à la cuisson, la comparaison des cartes protéomiques à 20 minutes et à 6 heures *post mortem* a permis la détection de 187 spots, dont 34 spots montraient une intensité en évolution. Parmi eux, cinq spots étaient surexprimés et sept sous-exprimés à 20 minutes *post mortem* par rapport à 6 heures *post mortem*. Puis, 15 spots ont été détectés seulement à 20 minutes *post mortem* et sept ont été détectés seulement à 6 heures *post mortem*.

De la même façon que dans le groupe 'Fonte faible', nous observons une diminution globale de l'expression des protéines après refroidissement des foies gras.

**Tableau 18** : Protéines identifiées dans la fraction protéique soluble à faible force ionique des foies gras, dont l'expression évolue entre 20 minutes et 6 heures *post mortem* dans le groupe 'Fonte élevée' (n = 9) (moyenne ± écart-type).

Sequence reference	Spot number	Before chilling	After chilling	Protein name - Taxonomy	Score Mascot	Sequence coverage	Nb of peptides matched	Th. MW kDa	Th pI
<b>Oxido-reduction process</b>									
gfi228480202	219	0,20 ± 0,15	ND	DJ-1 protein - <i>Anas platyrhynchos</i>	61	16%	3	19950	6,33
gfi224058898	76	0,32 ± 0,35	0,16 ± 0,14	Aldehyde dehydrogenase 9 - <i>Taeniopygia guttata</i>	69	6%	3	51852	6,93
gfi118093103	196	0,27 ± 0,22	0,44 ± 0,48	Prdx3 protein - <i>Gallus gallus</i>	155	8%	2	30972	8,4
<b>Metabolism</b>									
gfi224058918	117	1,16 ± 0,68	0,26 ± 0,25	Glutamine synthetase - <i>Taeniopygia guttata</i>	157	17%	5	42181	6,47
gfi212727035	154	0,68 ± 0,77	0,27 ± 0,34	Fatty acid synthase - <i>Anas platyrhynchos</i>	157	4%	2	10130	5,48
FTNGVNY03F0Z2Y.s.ap.2	302	ND	0,96 ± 0,95	Triosephosphate isomerase 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	108	37%	14	43668	8,77
<b>Proteolytic activity</b>									
gfi45384002	222	0,51 ± 0,32	ND	Cathepsin D precursor - <i>Gallus gallus</i>	65	17%	6	43270	5,9
<b>Chaperone</b>									
FTNGVNY03F03OW.s.ap.2	41	0,98 ± 0,89	ND	Heat shock protein 70B - <i>Anas platyrhynchos</i>	88	17%	8	84166	6,72
FTNGVNY03F0AQR.s.ap.2	68	0,81 ± 0,74	ND	Heat shock 60kDa protein 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	74	17%	9	92538	8,46
<b>Miscellaneous</b>									
EF152289.s.ap.2	294	0,35 ± 0,19	ND	Albumin - <i>Anas platyrhynchos</i>	75	18%	8	67251	8,45
FTNGVNY04IB8UB.s.ap.2	20	0,20 ± 0,17	ND	Transferrin - <i>Anas platyrhynchos</i>	87	21%	10	41969	8,53
gfi3024757	16	0,28 ± 0,17	ND	Ovotransferrin - <i>Anas platyrhynchos</i>	44	6%	4	75584	6,19
FTNGVNY03F2B6X.s.ap.2	11	0,20 ± 0,14	ND	Valosin-containing protein - <i>Anas platyrhynchos</i>	91	22%	15	92797	5,56
FTNGVNY03GL28P.s.ap.2	129	0,31 ± 0,33	ND	Actin. cytoplasmic type 5 - <i>Anas platyrhynchos</i>	78	44%	7	21598	5,32
FTNGVNY03F2ZPP.s.ap.2	88	0,28 ± 0,23	0,09 ± 0,09	Fibrinogen gamma chain - <i>Anas platyrhynchos</i>	140	28%	19	70564	6,62
FTNGVNY03F3RUW.s.ap.2	95	ND	0,55 ± 0,91	ATP synthase subunit beta - <i>Anas platyrhynchos</i>	143	47%	21	54441	5,11
GIDS3QQ02D8Q90.s.ap.2	209	0,68 ± 0,72	1,90 ± 1,54	ep37-A2 - <i>Anas platyrhynchos</i>	109	52%	12	30653	8,51

<sup>a</sup> Le nom des protéines et la référence des séquences sont issues des bases de données Swiss-Prot et EST. <sup>b</sup> Le seuil de significativité du score MASCOT est 67. <sup>c</sup> Recouvrement de la séquence exprimé en pourcentage de la séquence entière en acides aminés. <sup>d</sup> Nombre de peptides matchés lors de la recherche dans les bases de données. <sup>e</sup> Poids moléculaire (en kDa) et point isoélectrique théoriques (issus des bases de données UniProtKB/Swiss-Prot pour la partie MALDI-TOF et NCBI 'mammalian taxonomy' pour la partie LC-MS/MS). <sup>f</sup> La protéine DJ-1 (spot 219), l'aldéhyde déshydrogénase 9 (spot 76), la protéine Prdx3 (spot 196), la glutamine synthétase (spot 117), la fatty acid synthase (spot 154) et la protéine 'Valosin containing' (spot 11) ont été identifiées par LC-MS/MS.

La spectrométrie de masse – MALDI-TOF et LC-MS/MS – a permis l'identification de 17 protéines parmi les 34 spots d'intérêt. Les séquences protéiques ont été identifiées par comparaison avec les banques de données *Gallus gallus* et *Anas platyrhynchos*.

Les 17 protéines identifiées peuvent être classées selon leurs fonctions biologiques (Tableau 18) : trois sont impliquées dans le stress cellulaire oxydatif, trois sont impliquées dans le métabolisme énergétique, une a une activité protéolytique, deux ont une activité de chaperone et huit sont des protéines aux fonctions diverses.

En résumé, lors de la réfrigération, quel que soit le niveau de fonte à la cuisson, l'évolution du profil protéique se caractérisait par la sous expression des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et dans les processus d'oxydo-réduction, ainsi que des protéines aux activités protéolytiques et de chaperone.

Les protéines dont l'évolution de l'expression au cours de la réfrigération est liée à la fonte lipidique à la cuisson ont été classées selon leur fonction biologique. Les résultats mis en parallèle entre les deux niveaux de fonte sont détaillés dans la partie qui suit.

### **Processus d'oxydo-réduction.**

Dans le groupe 'Fonte faible', parmi les spots d'intérêt dont l'évolution de l'expression au cours du refroidissement est reliée à la fonte lipidique, quatre ont été identifiés comme étant des protéines impliquées dans des processus d'oxydo-réduction. L'aldéhyde déshydrogénase 2 (spots 79, 85 et 86) et la superoxyde dismutase 1 (SOD1) (spot 194) ont été détectées uniquement à 20 minutes *post mortem*, avant refroidissement. L'aldéhyde déshydrogénase 2 est impliquée dans la régulation des processus redox de la cellule. La SOD1 est une enzyme catalysant la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Elle intervient dans les mécanismes de défense contre les radicaux libres.

Dans le groupe 'Fonte élevée', trois spots dont l'évolution de l'expression au cours du refroidissement est reliée à la fonte lipidique à la cuisson correspondent à des protéines impliquées dans des processus d'oxydo-réduction. La protéine DJ-1 (spot 219) a été détectée uniquement à 20 minutes *post mortem*, avant refroidissement. L'expression de l'aldéhyde déshydrogénase 9 (spot 76) était supérieure avant refroidissement, et la Prdx3 (spot 196) présentait une expression supérieure après refroidissement.

### **Métabolisme.**

Dans le groupe 'Fonte faible', quatre spots dont l'expression évolue au cours du refroidissement ont été identifiés comme étant des protéines impliquées dans des réactions du

métabolisme énergétique. L'énolase 1 présente à la fois une surexpression (spot 100) et une sous-expression (spot 101) après refroidissement, à 6 heures *post mortem*. L'expression de la triosephosphate isomérase (spot 211) était supérieure après refroidissement. La fatty acid binding protein 4 (spot 304) a été détectée uniquement après refroidissement.

Dans le groupe 'Fonte élevée', parmi les protéines dont l'expression évolue au cours du refroidissement en relation avec la fonte lipidique à la cuisson, trois sont impliquées dans des processus métaboliques. Les expressions des protéines glutamine synthase (spot 117) et FAS (spot 154) étaient inférieures après refroidissement. La triosephosphate isomérase 1 (spot 302) a été détectée uniquement après refroidissement, à 6 heures *post mortem*. La glutamine synthase est impliquée dans le métabolisme de l'azote, en catalysant la condensation du glutamate pour former de la glutamine. La fatty acid synthase joue un rôle dans la synthèse des lipides en catalysant la formation des acides gras à longue chaîne à partir de l'acétyl-CoA, du malonyl-CoA et du NADPH.

### **Activité protéolytique.**

Dans le groupe 'Fonte faible', parmi les protéines dont l'évolution de l'expression au cours du refroidissement est reliée à la fonte lipidique à la cuisson, trois spots ont été identifiés comme étant des protéines aux activités protéolytiques. Ces trois spots sont sous exprimés après refroidissement. Il s'agit de la prepro-cathepsine D (spots 188 et 234) et la cathepsine D precursor (spot 222). La prepro cathepsine D est la forme inactive de la cathepsine D qui est une protéase aspartique lysosomale.

Dans le groupe 'Fonte élevée', un spot a été identifié comme étant une protéine avec une activité protéolytique : le précurseur de la cathepsine D (spot 222), et a été détectée uniquement avant refroidissement, à 20 minutes *post mortem*.

### **Chaperone.**

Quel que soit le niveau de fonte lipidique à la cuisson, les spots identifiés comme étant des protéines chaperones ont été détectés uniquement avant refroidissement.

Dans le groupe 'Fonte faible', cela concerne une protéine, la Heat Shock Protein 70B (HSP70) (spot 41).

Dans le groupe 'Fonte élevée', deux spots sont concernés et ont été identifiés comme étant la Heat Shock Protein 70 B également (spot 41) et la Heat Shock Protein 60 (HSP60) (spot 68).



## **Protéines aux fonctions diverses.**

Dans le groupe 'Fonte faible', trois protéines ont des fonctions biologiques diverses. La protéine ATP synthase (spot 95) a été détectée uniquement avant refroidissement. La protéine kinase C inhibitor (spot 182) et la régucalcine (spot 256) présentaient des expressions inférieures après refroidissement.

Dans le groupe 'Fonte élevée', parmi les huit protéines aux fonctions biologiques diverses, cinq ont été détectées uniquement avant refroidissement. Il s'agit de l'albumine (spot 294), la transferrine (spot 20), l'ovotransferrine (spot 16), la protéine 'valosin-containing' (spot 11) et l'actine cytoplasmique type 5 (spot 129). L'albumine est synthétisée dans le foie, c'est la principale protéine circulante du plasma sanguin. La transferrine et l'ovotransferrine sont des protéines de transport pouvant se fixer aux ions  $Fe^{3+}$ . Ces deux protéines diffèrent par leur composition en carbohydrates. La protéine 'valosin-containing' est une protéine de liaison à l'ATP qui appartient à la famille des AAA ATPases, et qui est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires. L'actine cytoplasmique type 5 est une protéine structurale. La protéine fibrinogène chaîne gamma (spot 88) présentait une expression inférieure après refroidissement. C'est une glycoprotéine pouvant être clivée en fibrine qui est le constituant le plus abondant des caillots sanguins. La protéine fibrinogène chaîne gamma est impliquée dans l'activation des plaquettes. L'ATP synthase (spot 95) a été détectée seulement après refroidissement. La protéine ep37-A2 (spot 209) présentait une expression inférieure après refroidissement. Cette protéine, connue également sous le nom de 'epidermis differentiation specific protein', appartient à la famille des beta / gamma crystallines.

## **6.2. Analyse de la fraction protéique non soluble à faible force ionique**

### ***6.2.1. Expression des protéines du foie gras au moment de l'éviscération***

Pour analyser la fraction protéique non soluble à faible force ionique, nous avons utilisé la méthode 'Shot-Gun' qui consiste en l'identification de l'ensemble des protéines séparées selon leur poids moléculaire sur gel SDS-PAGE. A 20 minutes *post mortem*, les résultats ont permis la détection et l'identification de 595 protéines, tous groupes de fonte confondus.

### **Légende des tableaux 19, 20, 22 et 23:**

<sup>a</sup> Le nom des protéines et la référence des séquences sont issues des bases de données Swiss-Prot et NCBI. <sup>b</sup> **Compartiments cellulaires** : Csq : cytosquelette ; Cy : cytoplasme ; EC : extracellulaire ; Go : appareil de Golgi ; Mb : membrane ; N : noyau ; Pr : protéasome ; Ri : ribosome. <sup>c</sup> **Processus biologiques** : CC : communication cellulaire ; COa : coagulation ; DiC : différenciation cellulaire ; MC : motilité cellulaire ; OC : organisation cellulaire ; PM : processus métabolique ; RDC : réponse de défense cellulaire ; RPB : régulation des processus biologiques ; RS : réponse à un stimulus ; T : transport. <sup>d</sup> **Fonctions moléculaires** : AC : activité catalytique ; AT : activité de régulateur de traduction ; E : régulateur d'activité enzymatique ; LM : liaison aux métaux ; LN : liaison aux nucléotides ; LP : liaison aux protéines ; Sig : transducteur de signal ; Str : activité structurale ; T : activité de transport. <sup>e</sup> Recouvrement de la séquence exprimé en pourcentages de la séquence entière en acides aminés. <sup>f</sup> Le nombre de peptides correspond aux peptides avec un taux de faux positif inférieur à 1.3%. <sup>a</sup> Protein Abundance Index (voir Matériel et Méthodes 5.3).

**Tableau 19** : Protéines identifiées uniquement dans la fraction soluble à force ionique élevée des foies gras du groupe 'Fonte faible' à 20 minutes *post mortem*.

Référence de la séquence <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	Recouvrement de séquence <sup>e</sup>	Nombre de peptides matchés <sup>f</sup>	PAI <sup>g</sup>
Q98TH5	Protéine ribosomale S11 - <i>Gallus gallus</i>	Ri	PM	Str	28,5	5	44,3
Q5ZK18	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	10,3	3	42,7
Q6ITC7	Protéine ribosomalee 40S S13 - <i>Gallus gallus</i>	Ri	PM	Str	33,1	3	39,7
Q5F412	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Csq	OC	LP	25,8	2	33,7
Q6EE61	Protéine ribosomale L17 (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Ri	PM	Str	27,4	4	31,8
Q5ZJ12	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy			18,7	6	31,7
P08636	Protéine ribosomalee 40S S17 - <i>Gallus gallus</i>	Ri	PM	Str	45,9	3	29,6
Q08200	Protéine ribosomalee 60S L10 (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Ri	PM	Str	22,4	5	28,6
Q9PVL6	Protéine 'mitochondrial carrier homolog' 2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	T		23,1	4	23,4
Q5ZLE6	Sous-unité H du facteur 3 d'initiation et traduction eucaryotique - <i>Gallus gallus</i>	Cy	OC	AT	19,8	3	23,0
Q3YI09	Sous-unité 2 non catalytique de la protéine kinase 5'-AMP gamma-1 - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	23,2	6	21,7
Q5ZLA5	Sous-unité E du facteur 3 d'initiation et translation eucaryotique - <i>Gallus gallus</i>	Cy	OC	AT	13,3	5	20,2
Q5ZK70	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	6,5	2	16,2
Q5F3N1	Protéine L-isoaspartate (D-aspartate) O-méthyltransférase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	22,4	3	13,2
Q5ZIV0	Sérine/thréonine-protéine phosphatase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	9,8	3	13,1
Q5ZLL5	Protéine 'Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5', mitochondriale - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	15,8	3	12,9
O13268	Sous-unité alpha 7 du protéasome - <i>Gallus gallus</i>	Pr	PM	AC	13,7	2	12,0
Q9I8D4	Fructose-1,6-bisphosphatase (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	7,7	2	11,9
Q5ZJZ5	D-beta-hydroxybutyrate déshydrogénase, mitochondriale - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	12,7	1	11,8
B3T7B3	Protéine CGI-58 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	14,3	4	11,7
Q5ZIP1	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	11,6	1	11,6
Q95HB3	Chaîne alpha de la protéine MHC classe I - <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	RS			9	11,3
Q156C7	Sous-unité beta-2 non catalytique de la protéine kinase '5'-AMP-activated' - <i>Gallus gallus</i>			AC	15	2	10,9
Q5ZLQ7	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	OC		12,3	4	10,7
A9CP13	D-serine déshydratase (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Mb			13,6	3	10,6
Q5ZIV8	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	DiC	LP	14,7	2	10,0
Q5ZIG4	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	14,6	1	10,0
Q5ZJ93	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	11,4	2	9,3
Q5ZHT1	Acyl-CoA déshydrogénase, membre 11 - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	8,5	5	9,0
Q5ZKX8	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AT	9,1	2	8,6
Q5ZLP8	Protéine 3 du facteur de croissance 2 'Insulin-like' - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	AT	9,1	2	8,6
B6V3H7	Protéine CAPN1 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	7,9	5	8,5
Q0KKP4	Lanosterol 14 alpha-déméthylase - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	8,1	3	8,5
Q2LAI0	Sous-unité catalytique alpha 2 de la protéine kinase '5'-AMP-activated' - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	7,4	1	7,2
Q2PUH1	Sous-unité catalytique alpha 1 de la protéine kinase '5'-AMP-activated' - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	8,9	3	7,1

Référence de la séquence <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	Recouvrement de séquence <sup>e</sup>	Nombre de peptides matchés <sup>f</sup>	PAI <sup>g</sup>
P13216	Adrénodoxine, mitochondriale (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	6,3	1	7,0
B2M0K4	ADP-dépendent glucokinase - <i>Cairina moschata</i>	Mb	PM	AC		1	6,8
Q5ZL59	Ubiquitine carrier protein' - <i>Gallus gallus</i>		RPB	AC	7,5	1	6,8
Q5F353	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Go	T	LP	7,3	1	6,8
Q90997	Protéine 1 de récepteur à la transferrine - <i>Gallus gallus</i>	Mb	OC	AC	6,1	2	6,4
P20678	Cytochrome P450 2H2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	4,1	1	6,1
Q8UUX5	Facteur d'échange GDP/GTP VAV2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	RPB	LM	5,1	3	6,0
Q5ZL25	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	OC	AT	8,8	2	5,7
Q5ZHM0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	5,6	2	5,6
Q5ZL61	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	T	LN	8	2	5,5
Q5ZK08	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	5,9	2	5,4
Q5ZK08	Chaîne lourde Ig Y (7.8S) - <i>Anas platyrhynchos</i>					3	5,2
Q5ZLB8	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	OC	AC	5,7	1	5,2
Q5ZLD4	Protéine transmembranaire 11 - <i>Gallus gallus</i>	Mb		LP	8,2	1	5,2
Q5F4B5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	4,5	1	4,7
Q805C1	Glycogènesynthase (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	3,8	1	4,2
O42133	Sous-unité de la mu-calpaïne - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	3,4	1	4,2
Q5ZMR2	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	1,9	1	4,2
Q5F430	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AT	4,3	1	4,1
Q5ZHQ6	Protéine 5 'Acyl-CoA-binding domain-containing' - <i>Gallus gallus</i>	Mb	T		6,3	2	4,1
Q5ZMU8	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Go	OC	LP	3,4	1	3,9
Q1HFX8	Chaîne beta de la protéine 'MHC class II' - <i>Cairina moschata</i>	Mb	RS			1	3,9
Q5ZJV9	Sous-unité 7 du complexe de traduction CCR4-NOT - <i>Gallus gallus</i>	N	RPB	AT	3,5	1	3,5
O42094	Alpha 1 intégrin - <i>Gallus gallus</i>	Mb	MC	Sig	3,8	2	3,4
Q5ZHL0	V-type proton ATPase sous-unité d 2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	4,3	1	2,8
Q5ZMS0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	N	OC	LN	2,2	2	2,8
Q90748	Myosine IB 'Brush border' - <i>Gallus gallus</i>	Csq	OC	LN	2,8	2	2,7
P18652	Protéine ribosomalee S6 kinase 2 alpha - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	3,3	2	2,7
P98157	Isoforme 1 du récepteur à la lipoprotéine de basse densité - <i>Gallus gallus</i>	Mb	OC	LM	1,4	2	2,6
Q5F319	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,7	1	2,6
Q5ZK65	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Go	T	LP	2,8	1	2,3
Q5ZIU9	Protéine ligase MIB2 de l'E3 ubiquitine - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	AC	2,2	1	2,1
Q5F3Q3	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		RPB	AC	2,2	1	1,9
Q9PW08	Aminopeptidase (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,1	1	1,8
Q5ZJT0	ATP-dépendent ARN hélicase SUPV3L1, mitochondriale - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	1,5	1	1,3

**Tableau 20** : Protéines identifiées uniquement dans la fraction soluble à force ionique élevée des foies gras du groupe 'Fonte élevée' à 20 minutes *post mortem*.

Référence de la séquence <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	Recouvrement de séquence <sup>e</sup>	Nombre de peptides matchés <sup>f</sup>	PAI <sup>g</sup>
Q00649	Heat shock protein beta-1 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	DiC	LP	37,8	6	46,6
P26932	Isoforme Alpha de la Calponine-1 - <i>Gallus gallus</i>		OC	LP	26,7	7	44,5
Q5ZMV5	Actine 'related protein' 2/3 complexe sous-unité 5 - <i>Gallus gallus</i>	Csq	RPB	LP	37,7	4	33,1
D0VX27	Ubiquinol-cytochrome c reductase mitochondriale 7.2 kda protéine - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	27,9	1	32,8
O57535	Nucleoside diphosphate kinase - <i>Gallus gallus</i>	Mb	DiC	AC	39,2	4	32,7
Q5ZL50	Profiline - <i>Gallus gallus</i>	Csq	OC	LP	42,9	4	28,6
C7EC61	Ferrochelatase - <i>Anas platyrhynchos</i>	Cy	PM	AC		4	28,2
Q5F425	Protéine 'lin-7 homolog C' - <i>Gallus gallus</i>	Mb	RPB	LP	21,8	3	25,4
Q5ZLJ0	Protéine putative non caractérisée (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy	DiC	AC	38,8	4	24,2
P84175	Protéine ribosomale 40S S12 - <i>Gallus gallus</i>	Ri	RPB	Str	13,6	2	22,7
Q25QX5	Protéine BASH/BLNK N-terminale associée - <i>Gallus gallus</i>	Mb			16,9	4	21,1
Q01841	Protéine glutamine gamma-glutamyltransférase 2 - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	12	8	20,3
Q5ZLI2	Protéasome sous-unité alpha - <i>Gallus gallus</i>	Pr	PM	AC	15,7	5	19,6
Q800K9	Protéine surféite locus 4 - <i>Gallus gallus</i>	Mb		LP	19,7	4	18,6
Q6EE30	Facteur d'élongation et de traduction eucaryotique 1 - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AT	8	5	18,3
P50655	ATP synthase 8 - <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	PM	AC		1	18,2
Q5ZLG6	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		Coa	LM	8,4	2	17,3
B2M0J6	Mn superoxide dismutase - <i>Cairina moschata</i>		PM	AC		2	16,9
Q66VY4	Facteur 'Splicing' 3a sous-unité 2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	CC	Str	17,5	3	15,9
Q9DF58	Intégrine kinase - <i>Gallus gallus</i>	Mb	RPB	AC	10,8	3	15,5
Q05423	Fatty acid-binding protein, cerveau - <i>Gallus gallus</i>	Cy	T	T	14,4	2	15,2
Q5ZKX9	Récepteur à la protéine ER lumen 2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	OC	Sig	10,4	2	14,2
Q5F387	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Sp		LM	11	2	14,0
A7WPN2	Protéine putative non caractérisée LOC769360 - <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	T			1	13,3
O42479	Ferrochelatase, mitochondriale - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	10,7	1	12,4
Q5ZHW5	Protéasome sous-unité alpha type - <i>Gallus gallus</i>	Pr	PM	AC	24,7	1	11,8
Q5ZKP5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	10,1	4	11,2
Q5ZI78	Protéine facteur de nécrose tumorale alpha 8 - <i>Gallus gallus</i>	Cy	DiC	LP	10,6	1	10,6
Q5ZML5	Protéine LSM12 (homologue) - <i>Gallus gallus</i>			LP	11,3	2	10,3
A6ZJ09	NADH-ubiquinone oxidoreductase chaîne 5 - <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	PM	AC		3	9,9
Q90WR6	Sulfotransférase 1C - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	9,1	1	9,8
Q5ZJ49	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	6,7	1	9,6
Q5ZIR0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb			24,3	1	9,3
B5AG23	Complément 3d - <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb		E		1	9,1

Référence de la séquence <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	Recouvrement de séquence <sup>e</sup>	Nombre de peptides matchés <sup>f</sup>	PAI <sup>g</sup>
Q90ZK7	Protéine putative FK506 - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	9,3	1	8,8
P51890	Lumicane - <i>Gallus gallus</i>	EC		AC	7,9	2	8,7
Q5ZLY3	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy		LP	9,4	3	8,5
Q07718	Protéine ES/130 (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Mb	T	Str	9,1	3	8,3
Q5ZI29	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	7,8	2	8,1
Q5ZLV0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	T	LP	8,5	1	8,1
Q5ZJY1	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	4,8	1	8,0
P05122	Créatine kinase type B - <i>Gallus gallus</i>	Cy		AC	7,1	1	7,9
Q5ZKH1	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	OC	Str	6,9	1	7,7
A6ZJ08	NADH-ubiquinone oxidoréductase chaîne 4 - <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	PM	AC		2	6,5
Q5ZMD2	Ankyrine 'repeat and MYND domain-containing protein' 2 - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	5,2	2	6,5
Q5ZII4	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	7,6	1	6,1
Q6EE60	Protéine ribosomale L18 (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Ri	PM	Str	7,8	1	6,0
A6ZJ01	Cytochrome c oxidase sous-unité 1 - <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	PM	AC		2	5,8
Q90952	Serum paraoxonase/arylestérase 2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	2,5	1	5,6
Q5ZLW1	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	5,2	2	5,6
P08642	Protéine GTPase HRas - <i>Gallus gallus</i>	Mb	DiC	AC	13,2	1	5,3
Q34160	Cytochrome b - <i>Cairina moschata</i>	Mb	PM	AC		2	5,3
Q98UJ7	Chaîne alpha-céto acide déshydrogénase E1-beta sous-unité - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	4,3	1	5,1
Q5ZKP8	Lysyl-tRNA synthétase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	4,2	1	5,1
Q5ZK09	Protéine non caractérisée 'C11orf73' (homologue) - <i>Gallus gallus</i>	Cy			6,6	1	5,1
Q5ZJL9	Domaine SAMet protéine 'HD domain-containing' 1 - <i>Gallus gallus</i>	N	RDC	AC	4,1	2	4,9
Q5ZLF6	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	T		4,6	1	4,6
Q802A0	Histidine ammonia-lyase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	6,2	2	4,5
Q6U7I1	Isoforme 1 de l'ubiquitine carboxyl-terminale hydrolase 7 - <i>Gallus gallus</i>	N	PM	AC	5,4	3	4,5
Q5ZM11	Arginyl-tRNA synthétase, cytoplasmique - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	3,8	1	4,5
Q5ZMN7	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	3,5	2	4,4
Q5F3X5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>			LP	6	1	4,1
Q5ZK86	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	4,8	1	4,0
Q5ZJP4	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	6,7	1	3,7
Q9PWC6	Ubiquitine carboxyl-terminale hydrolase - <i>Gallus gallus</i>				3,1	3	3,6
Q5ZL34	Sous-unité 6 du facteur de polyadénylation spécifique - <i>Gallus gallus</i>	N	PM	LN	6,9	1	3,6
Q5ZLI9	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	3	1	3,0
Q8AWB7	Sous-unité de la protéine SMC1 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	OC	AC	2,3	1	2,4
P47990	Xanthine déshydrogénase/oxydase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	DiC	AC	3,3	1	2,2
Q5ZME3	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	1,1	1	0,9
Q5ZIC1	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	CC	AC	1,5	1	0,8

L'analyse des résultats est effectuée grâce au logiciel ProteinCenter. Dans un premier temps, il s'agissait de regrouper l'ensemble de ces protéines de façon à former des groupes qui entreraient alors dans la comparaison des données. Ces groupes étaient formés de protéine(s) sur la base d'une homologie de séquence de 60 %. L'objectif était de ne pas prendre en compte dans la comparaison des données des protéines considérées différentes par le logiciel mais pourtant identiques. Le résultat de ce prétraitement montrait que 70 groupes de protéines étaient spécifiques des foies gras présentant un niveau de fonte faible (Tableau 19) et 71 groupes étaient spécifiques du niveau de fonte élevée (Tableau 20). Dans chacun des tableaux, la protéine la plus abondante au sein d'un groupe de protéines est présentée.

L'ensemble des protéines spécifiques au groupe 'Fonte élevée' d'une part et spécifiques au groupe 'Fonte faible' d'autre part ont été comparées. Pour déterminer la représentativité relative de ces protéines au sein de chaque groupe, un indice d'abondance (PAI pour 'Protein Abundance Index, voir Matériels et Méthodes 5.3) a été calculé. Il permet de déterminer l'abondance relative de chaque protéine majeure d'un groupe au sein de l'échantillon.

Les données obtenues ont été alors comparées à la banque de données 'Gene Ontology' pour déterminer la significativité de ces résultats en termes de compartiment cellulaire, processus biologique et fonction moléculaire.

L'analyse des protéines spécifiques des deux niveaux de fonte respectifs indiquait que les principaux compartiments cellulaires identifiés étaient le cytoplasme et la membrane. La fonte lipidique à la cuisson n'a cependant pas été reliée à une surexpression de protéines localisées dans un compartiment cellulaire en particulier.

De plus, environ la moitié des protéines identifiées est impliquée dans des processus métaboliques, et ce quel que soit le niveau de fonte à la cuisson.

La comparaison des 71 groupes de protéines spécifiques du niveau de fonte élevée avec la banque Gene Ontology n'a pas révélé de résultats significatifs, quel que soit le critère. Mais, parmi les 71 groupes de protéines, deux présentaient des PAI nettement supérieurs au reste des protéines spécifiques, avec un écart de 10 points. Ces deux groupes ne comportaient chacun qu'une protéine : la protéine HSP 27 (pour 'Heat Shock Protein 27') et l'isoforme alpha de la calponine-1. La protéine HSP 27 contribue à la stabilisation des filaments



**Tableau 21** : Résultats des Dot-Blots des protéines ribosomales L10 et S17 et du Western-Blot de la protéine MIMP, des échantillons de foies gras prélevés à 20 minutes *post mortem*. Les résultats sont présentés selon la comparaison des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’ du second volet du projet.

	Fonte faible	Fonte élevée	Statistiques
Effectif	n = 13	n = 12	
Protéine ribosomale L10	0,17 ± 0,11	0,21 ± 0,08	NS
Protéine ribosomale S17	0,32 ± 0,13	0,29 ± 0,06	NS
Protéine MIMP	0,87 ± 0,33	0,59 ± 0,22	*

<sup>1</sup> Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte : NS :  $p > 0,05$ , \* :  $p < 0,05$ .

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type et sont exprimés en volume relatif exprimé en pourcentage de la référence.

intracellulaires d'actine et pourrait donc jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette. La calponine est une protéine de liaison au calcium, elle est impliquée dans la régulation et la modulation de la contraction du muscle lisse.

En revanche, l'analyse des 70 groupes de protéines spécifiques de la fonte faible a révélé que les 13 groupes présentant un PAI supérieur à 15 appartenaient principalement aux ribosomes ( $p=5,3.10^{-5}$ ), étaient impliqués dans le processus de traduction ( $p=2,3.10^{-3}$ ) et correspondaient à la fonction de constituant structural des ribosomes ( $p=5,2.10^{-5}$ ). En réalité, ces 13 groupes de protéines étaient constitués chacun par une protéine : la protéine ribosomale S11, la protéine ribosomale 40S S13, la protéine ribosomale L17 (fragment), la protéine ribosomale 40S S17, la protéine ribosomale 60S L10 (fragment), la protéine 'mitochondrial carrier homolog 2' (MIMP), la sous-unité non catalytique gamma-1 de la protéine kinase 5' AMP, la sous-unité E du facteur d'initiation de traduction eucaryotique, la sous-unité H du facteur d'initiation de traduction eucaryotique, et enfin quatre protéines non identifiées.

Dans le cadre du second volet du projet, nous avons cherché à valider ce résultat sur un réplicat biologique par des méthodes immunologiques. Ainsi, parmi les protéines testées en Western et Dot-Blot dans ce sous-ensemble de protéines, la MIMP et les protéines ribosomales L10 et S17 remplissaient les conditions d'analyse (c'est-à-dire la spécificité vis à vis de la protéine recherchée et une linéarité du signal obtenu selon la concentration en protéines). Nous avons donc réalisé des Western et Dot-Blot pour rechercher de façon spécifique l'expression de ces protéines sur les échantillons prélevés dans le second volet du projet. En ce qui concerne les protéines ribosomales L10 et S17, les résultats n'ont pas permis de confirmer leur surexpression à 20 minutes *post mortem* dans le groupe 'Fonte faible' (Tableau 21). En revanche, en ce qui concerne la protéine MIMP, les résultats acquis par spectrométrie de masse sont confirmés par l'approche Western-Blot (Tableau 21).

### *6.2.2. Expression des protéines du foie gras au cours de la réfrigération*

La comparaison de l'expression des protéines à 20 minutes et à 6 heures *post mortem* au sein de chaque niveau de fonte permet d'étudier l'évolution du protéome du foie gras au cours du refroidissement. La comparaison est réalisée sur les 554 groupes de protéines

**Tableau 22** : Protéines en augmentation au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte faible', détectées dans la fraction protéique soluble à force ionique élevée.

Référence de la protéine <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	ratio des PAI 6h/20'
P09207	Tubuline chaîne beta-6 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	AC	6,2
Q9W6H0	Mimecane - <i>Gallus gallus</i>	Mb	RS	AC	5,5
Q805C1	Glycogène synthase (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	4,0
Q5F4B5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	4,0
Q5F3Q3	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		RPB	AC	4,0
Q5ZK84	Alcool déshydrogénase [NADP+] - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	3,5
Q90WF0	Protéine CgABP260 - <i>Gallus gallus</i>			LP	3,4
Q90WF1	Filamine - <i>Gallus gallus</i>	Mb		LP	3,1
Q9IAY5	Protéine syndesmos - <i>Gallus gallus</i>	Mb		AC	3,0
Q8JGM8	Protéine 'BH3-interacting domain death agonist' - <i>Gallus gallus</i>	Cy	DiC	AC	3,0
Q5ZLD4	Protéine transmembranaire 11 - <i>Gallus gallus</i>	Mb		LP	3,0
Q5F470	Protéine Ras 'related protein Rab-8A' - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	AC	3,0
Q5F3B4	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>			AC	3,0
Q5KTT9	Facteur 4 eucaryotique d'initiation à la traduction gamma 2 isoforme 2 - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	TA	2,8
Q197X2	Apolipoprotéine B - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	AC	2,8
Q5ZK08	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,7
Q5ZLF0	Protéine 'Hsc70-interacting' - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	LB	2,7
Q8UWG6	Protéine kinase 2 extracellulaire - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	AC	2,4
Q91005	Alpha tropomyosine (cerveau) - <i>Gallus gallus</i>	Cy	DiC	Str	2,3
Q5F428	Facteur 3 eucaryotique d'initiation à la traduction sous-unité L - <i>Gallus gallus</i>	Cy	Coa	TA	2,3
P23991	Alcool déshydrogénase 1 - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,3
Q05705	Beta-tropomyosine - <i>Gallus gallus</i>	Cy		LP	2,1
Q9PW08	Amino-peptidase (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,0
Q90706	Protéine CLE7 - <i>Gallus gallus</i>			LP	2,0
Q5ZMB0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	2,0
Q5ZLR4	Protéine 'Epithelial splicing regulatory 2' - <i>Gallus gallus</i>	N	RPB	AC	2,0
Q5ZKG5	Phosphotyrosine phosphatase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,0
Q5ZI80	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	TA	2,0
Q5ZI14	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Pr	RPB	AC	2,0
Q05744	Cathepsine D - <i>Gallus gallus</i>	Cy	Coa	AC	2,0
P53449	Fructose-bisphosphate aldolase C (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,0
P23228	Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmique - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	2,0

**Tableau 23 :** Protéines en diminution au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte faible', détectées dans la fraction protéique soluble à force ionique élevée.

Référence de la protéine <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	ratio des
					PAI 6h/20'
Q9PW24	Protéine 'RNA-binding HuA' - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	LN	0,1
Q98TF8	Protéine ribosomale 60S L22 - <i>Gallus gallus</i>	Ri	CDi	Str	0,2
Q8AYP7	Hexokinase2 - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	0,2
Q6YJI5	tRNA guanosine-2'-O-methyltransferase TRM11 homologue - <i>Gallus gallus</i>		RBP	AC	0,3
Q6PVZ4	Type II alpha-keratine IIB - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	Str	0,3
Q5ZMU3	Glucose-6-phosphate isomérase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	0,3
Q5ZLC7	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	RPB	Sig	0,3
Q5ZL25	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	AT	0,3
Q5ZJZ5	D-beta-hydroxybutyrate déshydrogenase, mitochondrial - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	0,3
Q5ZKW4	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	0,3
Q5ZJD6	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy		AC	0,3
Q5ZJA5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Ri	RDC	AC	0,4
Q5ZJ60	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondriale - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	AC	0,4
Q5ZJ21	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	RDC	AC	0,5
Q5ZIZ5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		RPB	LN	0,5
Q5ZIP1	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	0,5
Q5ZI23	Isoforme 1 de la Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondriale - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	0,5
P98157	Isoforme 1 du récepteur à la LPL1 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	LM	0,5
P23668	Lectine 16 kDa beta-galactoside-binding - <i>Gallus gallus</i>				0,5
P28337	Aminomethyltransferase, mitochondriale - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	0,5
O57391	Gamma-énolase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	0,5
Q5W4S3	Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 6 (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy	CDi	AC	0,5
P09203	Tubuline chapine beta 1 - <i>Gallus gallus</i>	Cy	Coa	AC	0,5
D0VX30	Mitochondriale ubiquinol-cytochrome c réductase 14 kda protein - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	0,5
P00378	Dihydrofolate réductase - <i>Gallus gallus</i>	Csk	Coa	AC	0,5
P70080	Tryptophane 5-hydroxylase 1 - <i>Gallus gallus</i>		RPB	AC	0,5
P02127	Hémoglobine sous-unité rho - <i>Gallus gallus</i>	Cy	T	LM	0,5
Q5ZHM0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	0,5
Q5F3V1	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	EC	PM	AC	0,5
Q5F418	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 - <i>Gallus gallus</i>	Pr	RPB	E	0,5
P00523	Isoforme 1 de Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	AC	0,5
Q5F419	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>			Str	0,5
Q5H7M6	Protéine DRG1 (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy		LN	0,5
O42388	Ubiquitine-ribosomale protéine fusion protéine - <i>Gallus gallus</i>	Ri	PM	Str	0,5
P17790	Isoforme 1 de la basigine - <i>Gallus gallus</i>	Mb			0,5

**Tableau 24 :** Protéines en augmentation au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte élevée', détectées dans la fraction protéique soluble à force ionique élevée.

Référence de la protéine <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	ratio des PAI 6h/20'
Q5ZLA6	Myosin-Ic - <i>Gallus gallus</i>	Mb	T	AC	3,0
Q5ZJ22	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy		Sig	2,0
Q9YGW6	Ezrin - <i>Gallus gallus</i>	Mb		Str	2,1
Q9PU45	Radixin - <i>Gallus gallus</i>	Mb	RPB	Str	2,0
Q802A0	Histidine ammonia-lyase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,7
Q5ZKJ9	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	5,0
Q5ZIN1	Nuclear migration protein nudC - <i>Gallus gallus</i>	Cy	CDi	LP	2,2
Q8AWB7	SMC1 protein cohesin subunit - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	AC	2,7
Q5ZME3	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	4,0
P07322	Beta-enolase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,4
P50147	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 - <i>Gallus gallus</i>		CP	LN	2,0
Q5H7M6	DRG1 (Fragment) - <i>Gallus gallus</i>	Cy		LN	3,0
O12945	Vitronectin - <i>Gallus gallus</i>	EC	RS	AC	3,3
Q5F354	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	Str	2,2
O93601	Apolipoprotein AIV - <i>Gallus gallus</i>	EC	PM	AC	2,3
Q5ZMD2	Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2 - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	2,0
Q90952	Serum paraoxonase/arylesterase 2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	4,5
Q5ZLR4	Epithelial splicing regulatory protein 2 - <i>Gallus gallus</i>	N	RPB	AC	2,0
P62801	Histone H4 - <i>Gallus gallus</i>	N	RPB	AC	2,4
Q5ZIZ5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		RPB	LN	2,0
Q5ZLH7	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>			LN	2,0
Q5ZIZ4	Cytosolic purine 5'-nucleotidase - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,6
Q5ZKQ2	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	3,5
Q8QH01	Flavin-containing monooxygenase 3 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	2,5
Q5ZHS2	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	PM	AC	2,0
Q9PW38	Gephyrin - <i>Gallus gallus</i>	Mb	CDi	AC	2,7
Q9I9B8	Non-Canonical Ubiquitin Conjugating Enzyme 1 - <i>Gallus gallus</i>		RPB	AC	3,0
Q5ZM11	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,0

Référence de la protéine <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	ratio des PAI 6h/20'
Q5ZJQ5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,5
Q5F3C0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,2
Q5ZMI5	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	AC	2,0
Q5ZIC3	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	2,0
Q5ZHW5	Proteasome subunit alpha type - <i>Gallus gallus</i>	Pr	PM	AC	2,0
Q5ZJK3	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RPB	AT	6,0
P53478	Actin, cytoplasmic type 5 - <i>Gallus gallus</i>	Cy	CDi	LN	2,4
Q6PVZ4	Type II alpha-keratin IIB - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	Str	2,0
Q5ZL92	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	CDi	AT	3,0
Q6U7I1	Isoform 1 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 - <i>Gallus gallus</i>	N	PM	AC	2,2
Q5ZLI9	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	2,0
Q5ZJD6	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy		AC	2,0
Q5ZI60	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>			AC	3,7
Q5F3B4	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>			AC	2,0
Q5ZLQ6	14-3-3 protein beta/alpha - <i>Gallus gallus</i>	Cy	RBP	LP	2,9
Q5ZK94	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	N		LP	2,3
Q5ZIR0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb			2,0

**Tableau 25 :** Protéines en diminution au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte élevée', détectées dans la fraction protéique soluble à force ionique élevée.

Référence de la protéine <sup>a</sup>	Nom de la protéine <sup>a</sup> - Taxonomie	CC <sup>b</sup>	PB <sup>c</sup>	FM <sup>d</sup>	ratio des PAI 6h/20'
C7G537	ADF actine 'binding protein' - <i>Gallus gallus</i>			LP	0,5
Q5ZJ60	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondriale - <i>Gallus gallus</i>	Mb	Coa	AC	0,4
O57535	Nucleoside diphosphate kinase - <i>Gallus gallus</i>	Mb	CDi	AC	0,4
Q5ZID4	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	N	RPB	AC	0,3
Q5ZLC4	Oxysterol-binding protein' - <i>Gallus gallus</i>		PM		0,5
Q5ZL34	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6' - <i>Gallus gallus</i>	N	PM	LN	0,5
Q5ZJ68	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy	PM	AC	0,4
Q5ZIK6	Protéine 'BSD domain-containing protein 1' - <i>Gallus gallus</i>				0,3
Q5F428	Facteur eucaryotique d'initiation à la traduction 3 sous-unité L - <i>Gallus gallus</i>	Cy	Coa	AT	0,3
Q5ZMB0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>		PM	AC	0,5
Q5MAJ0	Protéine NOGO isoforme A2 - <i>Gallus gallus</i>	Mb	RPB	LP	0,3
Q5ZLV0	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Mb	T	LP	0,5
Q5ZL90	Protéine putative non caractérisée - <i>Gallus gallus</i>	Cy		LP	0,3

détectés dans le groupe 'Fonte faible' et sur les 562 groupes de protéines détectés dans le groupe 'Fonte élevée'. Pour déterminer si l'expression de chaque groupe de protéines diminue ou augmente lors du refroidissement, le ratio des PAI aux deux temps *post mortem* est calculé. Un ratio supérieur à 2 indique une augmentation et un ratio inférieur à 0.5 indique une diminution.

Dans le groupe des foies gras présentant un niveau de fonte à la cuisson faible, les résultats ont montré que 32 groupes de protéines étaient en augmentation (Tableau 22) et 35 en diminution (Tableau 23) au cours du refroidissement. La comparaison de ces groupes de protéines avec la banque de données Gene Ontology n'a pas permis de mettre en évidence de résultats significatifs en termes de compartiment cellulaire, de processus biologique ou encore de fonction moléculaire.

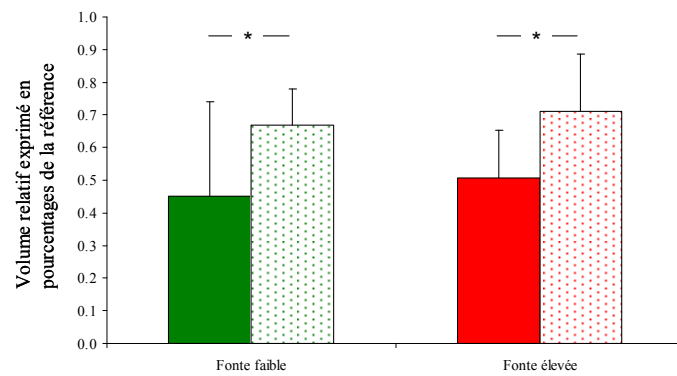
Dans le groupe des foies gras présentant un niveau de fonte à la cuisson élevée, les résultats ont montré que 45 groupes de protéines étaient en augmentation (Tableau 24) et 13 en diminution (Tableau 25) au cours du refroidissement. La comparaison des 13 groupes en diminution avec la banque Gene Ontology n'a pas donné de résultats significatifs. En revanche, les 45 groupes de protéines en augmentation présentent une forte représentativité des protéines du cytosquelette.

Les protéines correspondant à la dénomination Gene Ontology de compartiment cellulaire 'Protéines associées au cytosquelette' (FDR  $p$  value =  $3.17 \cdot 10^{-3}$ ) sont les suivantes : isoforme 1 de la F-actine 'capping' sous-unité beta, géphyrine, actine cytoplasmique type 5, protéine SMC1 ('protein cohesion subunit'), ezrine, radixine, protéine 'nuclear migration protein' (NudC), alpha-kératine IIB, protéine 14-3-3 beta/alpha, myosine Ic, protéine DRG1 (Fragment) et deux protéines non identifiées.

Les protéines correspondant à la dénomination Gene Ontology de fonction moléculaire 'Actin binding' sont les suivantes : radixine, isoforme 1 de la F-actine 'capping' sous-unité beta, géphyrine, actine cytoplasmique type 5, ezrine, myosine Ic et une protéine non identifiée.

Les protéines correspondant à la dénomination Gene Ontology de fonction moléculaire 'Lyase activity' sont les suivantes : isoforme 1 de la F-actine 'capping' sous-unité beta, cytosolique purine 5'-nucleotidase, serum paraoxonase, beta-énolase, histidine ammonia-lyase et une protéine non identifiée.





**Figure 21** : Résultats des Dot-Blots de la protéine beta-énolase. Les résultats sont présentés en volume relatif exprimé en pourcentage de la référence protéique (moyenne  $\pm$  écart-type), pour les foies gras du groupe ‘Fonte faible’ (n = 13) et ‘Fonte élevée’ (n = 12).

Dans le cadre du second volet du projet, nous avons cherché à valider ce résultat sur un réplikat biologique par des méthodes immunologiques. La beta-énolase remplissait les conditions de spécificité et de linéarité en Dot-Blot. Nous avons donc étudié son expression au sein de chaque groupe de fonte au cours du refroidissement, à 20 minutes et à 6 heures *post mortem* (Figure 21). Les résultats indiquent une surexpression de la bêta-enolase après réfrigération – à 6 heures *post mortem* – quel que soit le niveau de fonte à la cuisson. En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence selon le niveau de fonte, quel que soit le temps *post mortem*.

En conclusion, l'étude de l'expression des protéines du foie gras a été conduite par une approche complémentaire : il s'agissait d'analyser les fractions protéiques séparément et ainsi obtenir une meilleure résolution des résultats pour chacune d'elles. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au lien entre la fonte lipidique à la cuisson et l'expression des protéines à l'abattage, au plus près de l'animal vivant. Dans un second temps, nous avons regardé, au sein de chaque niveau de fonte, l'évolution de l'expression des protéines. Les résultats ont montré un profil différent entre les deux groupes de fonte ; ceci suggère que la fonte lipidique à la cuisson pourrait avoir un lien avec l'évolution du tissu au cours du refroidissement. Ces éléments seront discutés en détail dans la partie « Discussion » de ce mémoire.

## **7. Histologie et microscopie**

Les méthodes d'observation en microscopie du foie gras reposent sur deux techniques de préparation de l'échantillon qui sont complémentaires.

La cryo-fixation, suivie de coupes à congélation, permet d'une part de fixer le tissu sans utiliser de solvant – et donc sans éluer les lipides – et d'autre part de superposer plusieurs colorations sur une même coupe et ainsi obtenir des informations complémentaires sur une même zone d'analyse. Cette méthode présente aussi l'avantage de maintenir les sites antigéniques dans leur intégrité et rend possible la réalisation de l'immuno-marquage et des colorations histologiques sur une même coupe. Mais la confection des coupes à congélation de foie gras est difficile et oblige à une certaine épaisseur de coupe qui limite la résolution numérique.

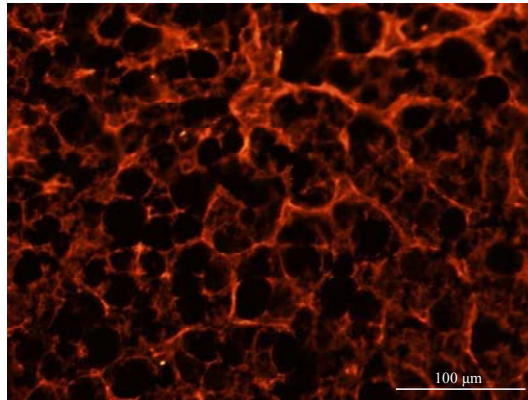
La fixation chimique, suivie d'une inclusion en résine Epoxy améliore la résolution des images. Cependant, les phases de déshydratation à l'alcool doivent être écourtées pour assurer la conservation des lipides au sein des cellules. Cette méthode de préparation permet par ailleurs l'observation en microscopie optique à l'échelle des gouttelettes lipidiques, et l'observation en microscopie électronique à transmission à l'échelle ultrastructurale. Les critères morphologiques de chaque gouttelette sont alors quantifiés par analyse d'images.

Plus récemment, nous avons pu caractériser le foie gras en microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR pour 'Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) et en microspectroscopie de fluorescence en ultraviolet (UV) grâce à l'utilisation d'un rayonnement synchrotron. Même si pour des raisons de temps les résultats présentés dans ce manuscrit sont préliminaires, ils apportent des informations originales et pertinentes pour notre problématique.

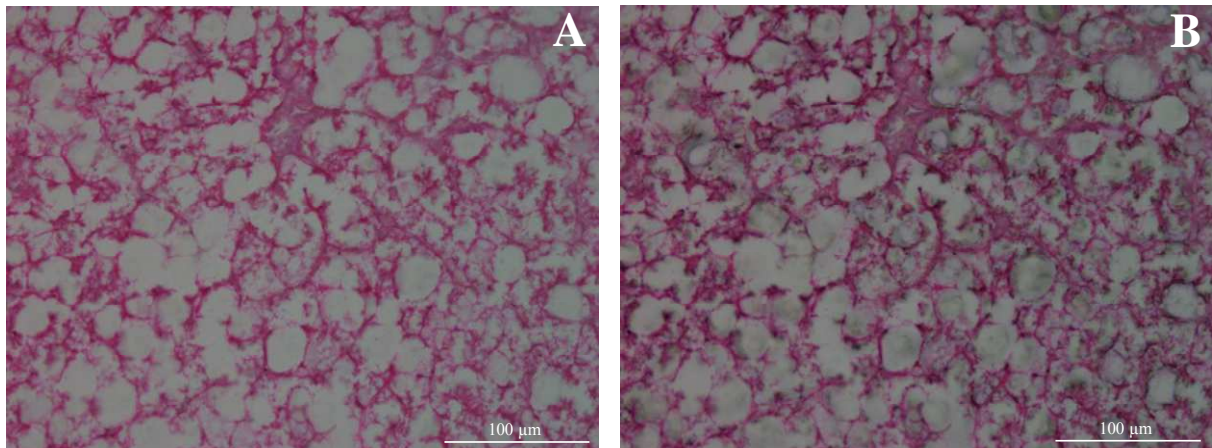
### 7.1. Etude de la structure et de la composition du tissu hépatique

Pour caractériser la structure du tissu hépatique, nous avons utilisé des échantillons cryo-fixés. La congélation ultra-rapide permet d'acquérir des données multiples sur une même zone d'analyse. Les acquisitions ont été réalisées sur des coupes de foies gras prélevés à 20 minutes *post mortem* (à l'éviscération), à 6 heures *post mortem* (après réfrigération) et après cuisson.

Dans un premier temps, un immuno-marquage du collagène de type III a été réalisé, les observations étaient effectuées dans l'UV grâce au fluorochrome Cyanine (CY3). Une fois que cette première série d'acquisition a été faite, nous avons procédé aux colorations successives de la matrice non lipidique par la combinaison de l'hématoxyline et de l'éosine (avec des observations dans le visible), et enfin des lipides grâce à la coloration Rouge de Nile (avec des observations en fluorescence selon les fluorochromes CY3 et Fluorescein Isothiocyanate – FITC). Les acquisitions en fluorescence ont été réalisées selon deux temps de pose : l'objectif était de s'affranchir de l'influence du temps de pose sur l'intensité de fluorescence observée et donc de son impact sur la signification biologique des observations. Les acquisitions en microscopie optique correspondant à la coloration de la matrice non lipidique ont été réalisées selon deux réglages du diaphragme. Lors de la mise au point de la méthode, nous avons observé lorsque le diaphragme est entièrement ouvert, l'apparition de teintes grisées colorées en fluorescence par la coloration des lipides. Nous avons donc jugé



**Figure 22** : Immunomarquage du collagène d'une coupe de foie gras (20 minutes *post mortem*) observée en microscopie à épifluorescence (filtre CY3, temps de pose 40 ms).



**Figure 23** : Images de foie gras prélevé à 20 minutes *post mortem* (coloration HE, image acquise avec le diaphragme partiellement (A) ou totalement (B) ouvert).

**Tableau 26** : Résultats de l'analyse d'images à partir des acquisitions en microscopie optique des colorations réalisées sur coupes à congélation de foies gras prélevés à l'éviscération (20 minutes *post mortem*), avant cuisson (à 6 heures *post mortem*, après réfrigération), et après cuisson. Les résultats portent sur les acquisitions de l'immunomarquage du collagène, de la coloration des structures non lipidiques et de la coloration des lipides. Les taux de matrice et niveaux de gris ont été calculés comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes 6.2.

	Fonte faible			Fonte élevée			Statistiques		
	A l'éviscération	Avant cuisson	Après cuisson	A l'éviscération	Avant cuisson	Après cuisson	Fonte	Temps	Fonte * Cuisson
<b>Immunomarquage du collagène</b>									
<i>Taux de matrice :</i>									
à 40 ms de temps de pose	14,0 ± 6,4	a 12,1 ± 4,8	a 29,9 ± 5,4	b 12,9 ± 4,6	a 13,1 ± 1,7	a 31,9 ± 5,8	b NS	**	NS
à 200 ms de temps de pose	21,4 ± 8,1	a 16,1 ± 5,3	a 33,0 ± 2,8	b 20,0 ± 8,2	a 20,1 ± 6,0	a 47,5 ± 0,8	b NS	**	NS
<b>Coloration des structures non lipidiques</b>									
<i>Taux de matrice :</i>									
Fond clair FC1	26,0 ± 5,2	a 27,3 ± 4,9	a 47,0 ± 4,9	b 23,4 ± 5,1	a 24,8 ± 1,4	b 47,9 ± 3,8	NS	**	NS
Fond clair FC2	30,0 ± 6,3	a 31,5 ± 5,0	a 54,1 ± 3,6	b 27,9 ± 6,7	a 28,0 ± 1,7	b 52,6 ± 4,0	NS	**	NS
Commun à FC1 et FC2	23,3 ± 6,4	a 25,1 ± 4,0	a 46,6 ± 5,1	b 22,1 ± 4,9	a 22,1 ± 1,2	b 46,4 ± 4,5	NS	**	NS
Spécifique FC1	2,7 ± 2,1	a 2,3 ± 0,9	a 0,4 ± 0,3	a 1,3 ± 0,2	a 2,8 ± 2,6	a 1,5 ± 1,3	NS	NS	NS
Spécifique FC2	6,7 ± 2,3	a 6,4 ± 2,9	a 7,6 ± 4,0	a 5,8 ± 2,3	a 5,9 ± 2,5	a 6,2 ± 3,7	NS	NS	NS
<b>Coloration des lipides</b>									
<i>Taux de matrice :</i>									
Filtre CY3 à 50 ms de temps de pose	28,0 ± 7,4	a 28,5 ± 8,5	a 41,7 ± 3,3	b 28,2 ± 4,5	a 30,1 ± 2,2	a 44,0 ± 4,0	b NS	**	NS
Filtre CY3 à 100 ms de temps de pose	32,6 ± 8,5	a 34,0 ± 8,4	a 46,6 ± 4,7	b 32,6 ± 4,5	a 35,3 ± 3,3	a 50,1 ± 2,4	b NS	**	NS
Filtre FITC à 50 ms de temps de pose	23,7 ± 8,7	a 22,6 ± 10,9	a 46,7 ± 5,6	b 21,4 ± 10,2	a 25,4 ± 4,0	a 41,4 ± 3,5	b NS	**	NS
Filtre FITC à 200 ms de temps de pose	28,5 ± 5,3	a 27,2 ± 7,4	a 45,4 ± 5,9	b 28,1 ± 2,4	a 27,0 ± 3,0	a 45,0 ± 4,5	b NS	**	NS
<i>Niveau de gris moyen :</i>									
Filtre CY3 à 50 ms de temps de pose	22,3 ± 8,9	a 27,8 ± 10,6	a 26,4 ± 5,5	a 27,5 ± 2,3	a 29,6 ± 4,6	a 23,2 ± 7,0	a NS	NS	NS
Filtre CY3 à 100 ms de temps de pose	31,2 ± 12,2	a 40,3 ± 15,4	a 46,4 ± 10,8	a 39,1 ± 5,3	a 42,5 ± 5,9	a 40,5 ± 10,2	a NS	NS	NS
Filtre FITC à 50 ms de temps de pose	7,2 ± 3,2	a 6,7 ± 3,4	a 3,7 ± 0,8	a 9,6 ± 2,5	a 7,9 ± 2,0	a 3,2 ± 1,2	a NS	NS	NS
Filtre FITC à 200 ms de temps de pose	21,8 ± 4,9	a 22,3 ± 8,7	a 16,1 ± 3,4	a 26,0 ± 3,9	a 24,8 ± 5,5	a 13,6 ± 1,8	a NS	NS	NS
<i>Taux de matrice à 50 ms de temps de pose :</i>									
Commun à CY3 et FITC	18,4 ± 10,1	a 20,4 ± 9,7	a 42,8 ± 5,9	b 17,7 ± 7,9	a 22,8 ± 3,3	a 39,0 ± 4,2	b NS	**	NS
Spécifique CY3	5,3 ± 2,1	a 2,2 ± 1,4	a 3,5 ± 1,6	a 3,7 ± 2,8	a 2,6 ± 0,8	a 2,4 ± 1,5	a NS	NS	NS
Spécifique FITC	9,6 ± 5,5	a 8,1 ± 5,5	a 3,2 ± 1,7	a 10,5 ± 4,2	a 7,3 ± 2,2	a 8,1 ± 3,1	a NS	NS	NS

\* Niveau de significativité de l'effet du niveau de fonte, de l'effet de la cuisson et de leur interaction : NS :  $p > 0,05$ , \*\* :  $p < 0,05$ .

Dans une même ligne, des lettres différentes indiquent une différence significative au seuil de  $p=0.05$ . Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.

intéressant de compléter l'information en réalisant les acquisitions avec ces teintes grisées plus ou moins prononcées, voire absente dans certains cas.

Le traitement des données par analyse d'images comportait différentes approches. Dans un premier temps, le taux de matrice non lipidique a été calculé sur l'ensemble des acquisitions : il s'agit du ratio de matrice marquée ou colorée sur l'ensemble de l'image. Ensuite, nous avons mesuré le niveau de gris moyen par image pour les acquisitions correspondant à la coloration des lipides. Enfin, des calculs entre images ont été effectués entre les deux conditions d'acquisitions de la coloration des structures et entre les deux filtres de fluorescence de la coloration des lipides.

### *7.1.1. Immuno-marquage du collagène*

L'analyse des données de l'immuno-marquage du collagène (Figure 22) a consisté à extraire le taux de matrice sur l'ensemble des images acquises en fluorescence selon le filtre CY3, à deux temps de pose : 40 et 200 ms.

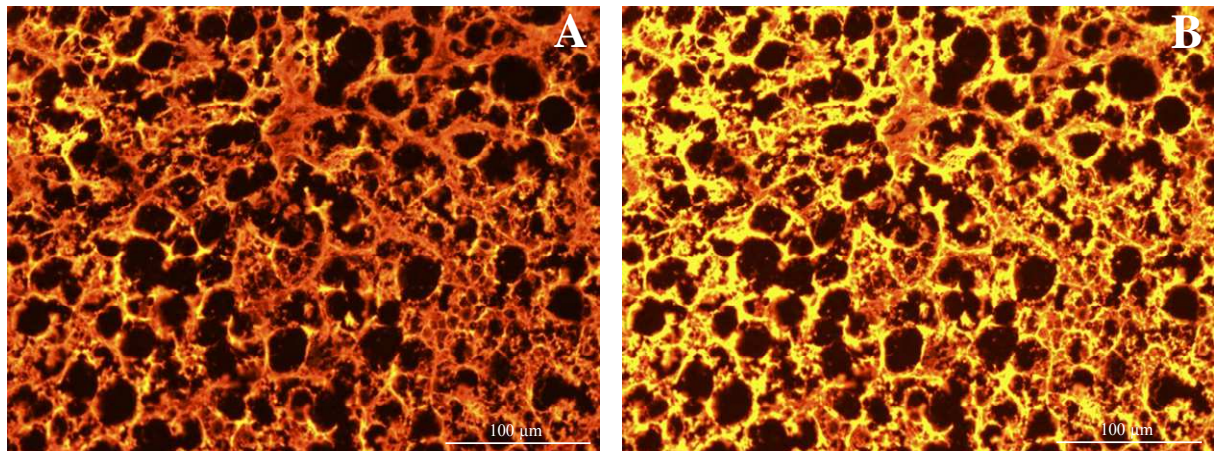
Quel que soit le temps de pose des acquisitions, le taux de matrice révélé par l'immuno-marquage du collagène n'est pas relié à la fonte lipidique à la cuisson (Tableau 26). Ceci est vrai pour tous les temps de prélèvement. En revanche, une augmentation de la densité de matrice après cuisson est observée dans les deux groupes de fonte.

L'augmentation du temps de pose induit une surévaluation du taux de matrice due à une diffusion du signal mesuré. Mais, cela n'intervient pas dans le profil général des résultats c'est-à-dire l'augmentation du taux de matrice après cuisson et l'absence d'effet 'Fonte' avant et après cuisson.

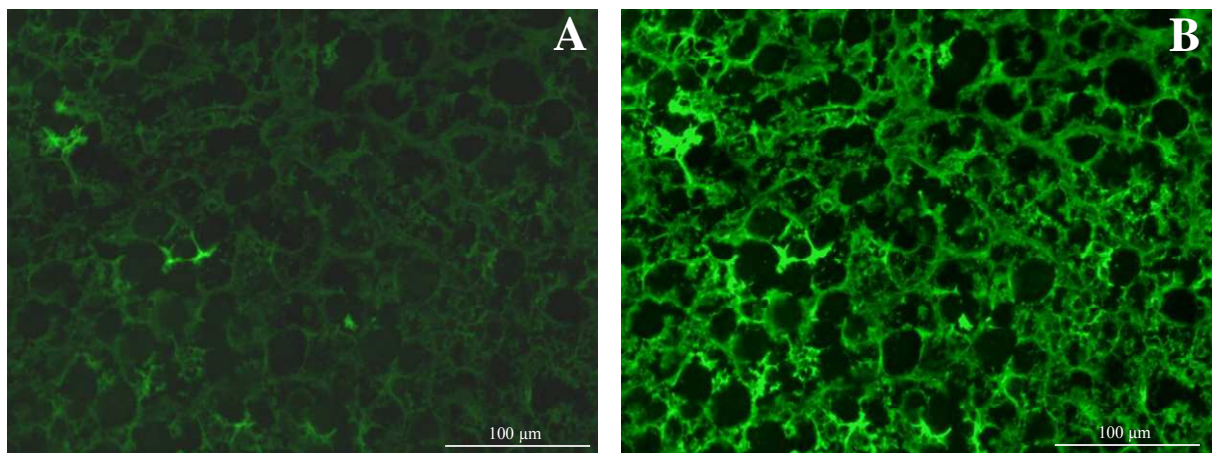
### *7.1.2. Coloration de la matrice non lipidique*

L'analyse des données de la coloration des structures non lipidiques selon la méthode Hématoxyline - Eosine a consisté à extraire le taux de matrice sur l'ensemble des images acquises à l'éviscération, après réfrigération (à 6 heures *post mortem*) et après cuisson.

Les acquisitions ont été réalisées selon deux réglages du diaphragme : le premier permettait d'observer principalement (voire uniquement) les structures (FC1 - Figure 23 A) et



**Figure 24 :** Images de foie gras prélevé à 20 minutes *post mortem* (coloration Rouge de Nile observée en fluorescence à l'aide du filtre CY3 (temps de pose : 50 ms (A) et 100 ms (B)).



**Figure 25 :** Images de foie gras prélevé à 20 minutes *post mortem* (coloration Rouge de Nile observée en fluorescence à l'aide du filtre FITC (temps de pose : 50 ms (A) et 200 ms (B)).

le second révélait des teintes grisées, situées à l'intérieur de ces structures, de façon spécifique ou plus marquée (FC2 - Figure 23 B).

Quel que soit le mode d'acquisition, le taux de matrice mesuré grâce à la coloration des structures n'est pas en lien avec le niveau de fonte lipidique à la cuisson que ce soit à l'éviscération, après réfrigération ou après cuisson (Tableau 26). Néanmoins, une fois encore, nous pouvons observer une augmentation de ce taux de matrice après cuisson.

De façon à analyser les différences entre les deux modes d'acquisition, nous avons cherché à semi-quantifier les teintes grisées supposées être des lipides de réserve. Pour cela, nous avons créé une image synthétique en superposant pour chaque champ d'analyse les deux modes d'acquisition montrant les teintes grisées claires ou absentes (FC1) ou prononcées (FC2).

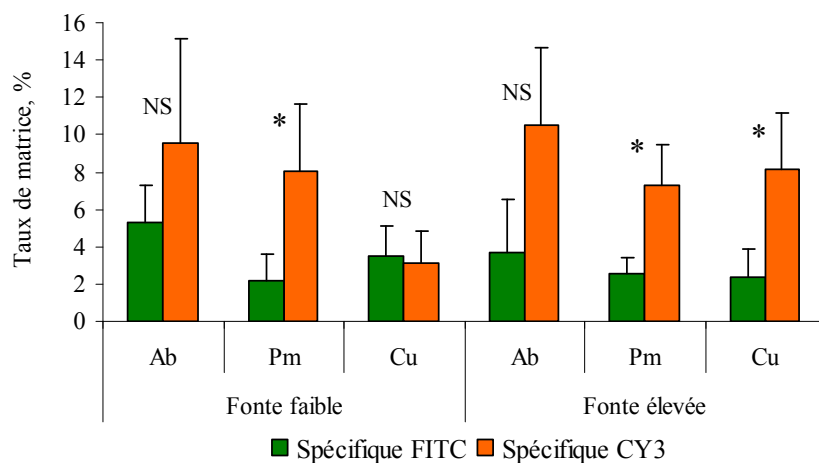
Ensuite, le taux de matrice commun ainsi que les taux spécifiques de chacune des conditions a été calculé (Tableau 26). Les calculs d'images n'ont pas permis de relier la fonte lipidique à la cuisson avec le taux de matrice commun aux deux conditions ni avec l'un ou l'autre des taux spécifiques.

### *7.1.3. Coloration des lipides*

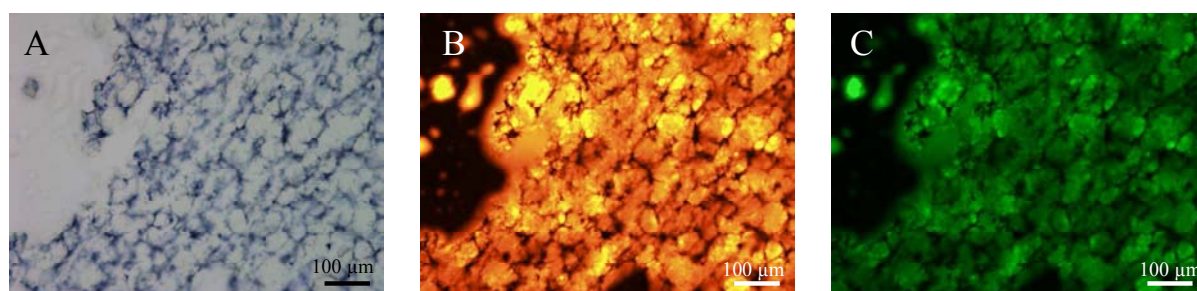
Initialement, la coloration Rouge de Nile avait pour but de colorer les lipides de réserve. Les images ont révélé un fort signal de la part des structures et un important photoblanchiment des lipides de réserve. Aussi, les données ont été traitées de deux façons. Dans un premier temps, le taux de matrice a été extrait de la même façon que pour les autres colorations. Comme évoqué précédemment, les acquisitions ont été réalisées pour les deux filtres de fluorescence de la coloration CY3 (Figure 24) et FITC (Figure 25) et selon deux temps de pose correspondant à un signal modéré et un signal intense.

Ensuite, en appliquant le masque binaire (image en noir et blanc) de la structure non lipidique de sorte à la masquer, nous avons mesuré le niveau de gris moyen de l'image afin d'obtenir une information sur les lipides de réserve. Ce calcul d'images a été réalisé à partir des acquisitions en filtre FITC et en CY3. Les résultats présentés dans le tableau 26 montrent que le niveau de gris moyen des images de la coloration des lipides n'est pas en lien avec le niveau de fonte, quel que soit le filtre et le temps de pose.





**Figure 26** : Taux de matrice spécifiques aux filtres FITC et CY3, selon le temps de prélèvement et le niveau de fonte. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la surface de l'image occupée par la matrice colorée (moyenne  $\pm$  écart-type) dans le groupe 'Fonte faible (n = 6) et le groupe 'Fonte élevée (n = 4). Les résultats sont présentés selon le temps de prélèvement : 'Ab' : à 20 minutes *post mortem*, à l'abattage ; 'Pm' : à 6 heures *post mortem*, après réfrigération ; 'Cu' : après cuisson.



**Figure 27** : Images de foie gras prélevé à 20 minutes *post mortem* (coloration au Bleu de Toluidine observée en fond clair (A), et au Rouge de Nile observée en épifluorescence à l'aide des filtres CY3 (B) et FITC (C).

Une précédente étude de Greenspan *et al.* (1985) avait démontré une spécificité de coloration des lipides de réserve et de structure en fonction du filtre de fluorescence. Nous avons donc étudié la différence d'informations acquises selon les deux filtres en superposant les images d'origine, à un même temps de pose de 50 ms, puis en dénombrant les pixels communs aux deux filtres et spécifiques de chacun d'eux. Les résultats concordent avec les précédents, ils mettent en évidence un effet 'cuisson' significatif sur le taux de matrice commun, mais aucun effet 'Fonte' sur l'ensemble des variables analysées. La figure 26 représente la comparaison des taux de matrice spécifiques aux filtres de fluorescence FITC et CY3, pour chaque temps de prélèvements, selon le niveau de fonte. Les résultats indiquent un taux de matrice spécifique à CY3 supérieur à celui spécifique à FITC à 6 heures *post mortem* quel que soit le niveau de fonte, et après cuisson dans le groupe 'Fonte élevée'.

La combinaison de colorations Hématoxyline Eosine – Rouge de Nile n'a pas permis clairement de mettre en évidence les lipides de réserve. En effet, les observations montrent un signal très intense des structures non lipidiques observées en fluorescence. De plus, nous avons pu constater un photoblanchiment très important, malgré l'automatisation des acquisitions. Les calculs d'images réalisés afin d'extraire le niveau de gris moyen n'a pas permis de s'affranchir de ces difficultés méthodologiques. C'est la raison pour laquelle dans le second volet, nous avons opté pour une méthode différente : la combinaison de la coloration au Bleu de Toluidine pour les structures non lipidiques (avec des observations dans le visible) et la coloration Rouge de Nile pour les lipides (avec des observations en fluorescence). Cette combinaison permet de mettre en évidence uniquement les lipides de réserve en fluorescence (Figure 27). De plus, un changement du système d'éclairage du microscope a été effectué ; la lampe à vapeur de mercure, dont l'intensité était non modulable, a été remplacée par un système d'éclairage X-cite qui grâce à son système de réglage de l'intensité permet de diminuer le photoblanchiment.

#### ***7.1.4. Combinaison des colorations Bleu de Toluidine et Rouge de Nile***

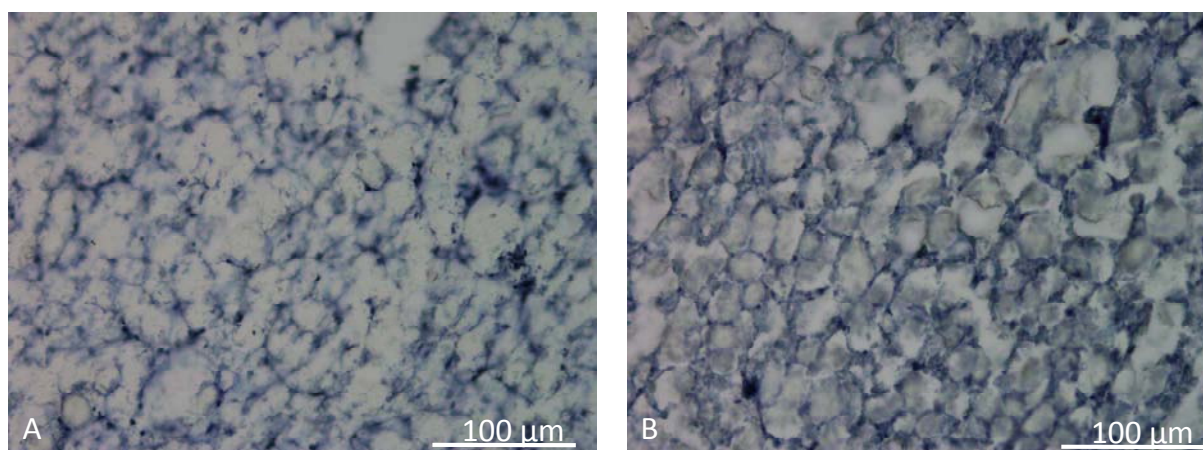
La combinaison des colorations Bleu de Toluidine, pour mettre en évidence les structures non lipidiques, et Rouge de Nile, pour mettre en évidence les lipides de réserve, a

**Tableau 27** : Taux de matrice des acquisitions réalisées à partir des coupes à congélation des échantillons prélevés avant et après cuisson, des groupes ‘Fonte faible’ et ‘Fonte élevée’. Les acquisitions ont été réalisées après coloration des structures non lipidiques au Bleu de Toluidine (acquisitions en fond clair), et après coloration des lipides de réserve au Rouge de Nile (acquisitions en fluorescence selon les filtres CY3 et FITC).

		Fonte faible n = 13		Fonte élevée n = 12		Statistiques		
		Avant cuisson	Après cuisson	Avant cuisson	Après cuisson	Fonte	Cuisson	Fonte * Cuisson
Coloration des structures non lipidiques	Fond clair	28,3 ± 1,7 <sup>a</sup>	38,8 ± 2,7 <sup>b</sup>	27,7 ± 4,0 <sup>a</sup>	41,0 ± 5,1 <sup>b</sup>	NS	**	NS
	Filtre CY3	56,0 ± 6,4 <sup>a</sup>	41,3 ± 6,7 <sup>b</sup>	58,1 ± 5,3 <sup>a</sup>	31,4 ± 8,5 <sup>c</sup>	**	***	NS
Coloration des lipides								
	Filtre FITC	44,8 ± 5,7 <sup>a</sup>	35,3 ± 5,7 <sup>b</sup>	46,1 ± 7,1 <sup>a</sup>	26,5 ± 8,0 <sup>c</sup>	**	***	NS

\* Niveau de significativité de l’effet du niveau de fonte, de l’effet de la cuisson et de leur interaction : NS :  $p > 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Dans une même ligne, des lettres différentes indiquent une différence significative au seuil de  $p=0,05$ . Les résultats sont présentés en moyenne ± écart-type.



**Figure 28** : Images de foies gras prélevés à 20 minutes *post mortem*, avant cuisson(A) et après cuisson (B) (coloration au Bleu de Toluidine).

été appliquée sur les échantillons de foie gras du second volet du projet, avant et après cuisson.

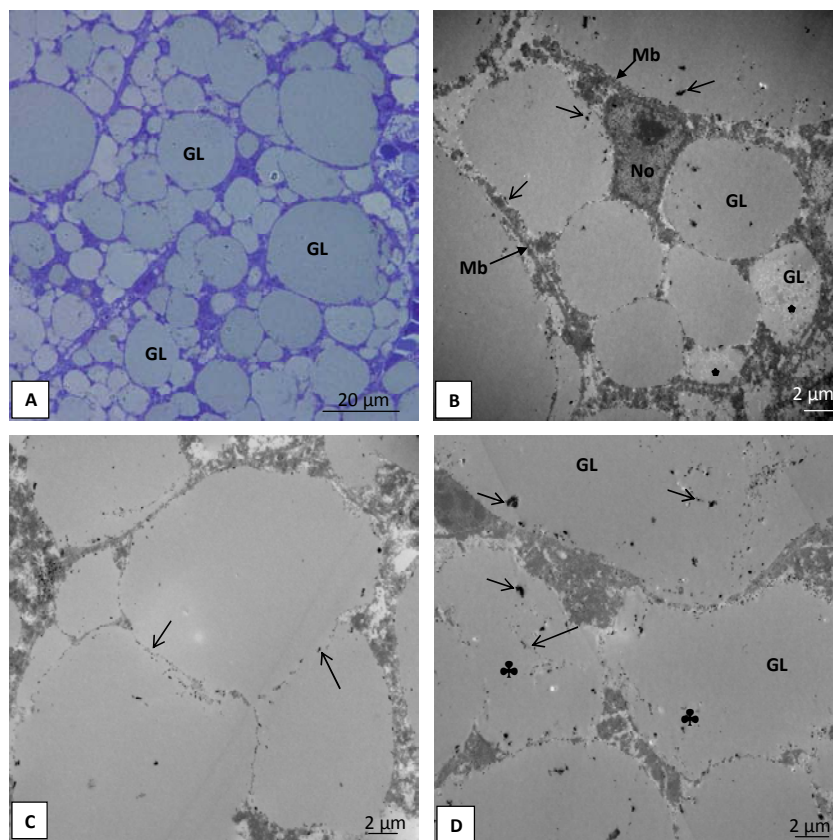
Le taux de matrice, correspondant au pourcentage de matrice colorée sur l'ensemble de l'image, a été calculée pour l'ensemble des acquisitions : les échantillons des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée', avant et après cuisson, en fond clair et en fluorescence selon les deux filtres CY3 et FITC. Les résultats sont présentés dans le tableau 27.

Le taux de matrice correspondant à la coloration des lipides est identique entre les deux niveaux de fonte avant cuisson. En revanche, après cuisson, le marquage des lipides de réserve est plus important dans le groupe 'Fonte faible'. De plus, quelles que soient les conditions, le taux de matrice des lipides de réserve est inférieur après cuisson, par rapport aux échantillons crus. Enfin, les résultats indiquent une augmentation du taux de matrice après cuisson, quel que soit le niveau de fonte, comme représenté dans la figure 28.

Pour évaluer le niveau de densification de la matrice non lipidique à la cuisson, nous avons calculé le rapport entre le taux de matrice après et avant cuisson. L'indice de densification est de  $1,35 \pm 0,12$  dans le groupe 'Fonte faible' et  $1,55 \pm 0,22$  dans le groupe 'Fonte élevée'. La différence entre ces deux valeurs est significative ( $p = 0,02$ ).

## 7.2. Etude de la morphologie des gouttelettes lipidiques

A partir des acquisitions réalisées en microscopie optique sur les inclusions en résine, nous avons effectué une analyse informatique des images à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband, W.S. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009). L'objectif était d'obtenir les paramètres d'aire, d'indice de forme et de niveaux de gris pour chaque gouttelette lipidique de façon individuelle. Pour cela, une méthode d'analyse d'images a été développée avec, dans un premier temps, une labellisation manuelle des gouttelettes avant une détection de chaque 'objet' à analyser par le logiciel. Dans la mesure où un grand nombre de gouttelettes a été détecté, nous avons pensé pertinent de traiter ces données en regroupant les gouttelettes par classes d'aire. La morphologie des gouttelettes a été étudiée avant cuisson (à 20 minutes *post mortem*) et après cuisson.



**Figure 29** : Morphologie des gouttelettes lipidiques de foie gras prélevé avant cuisson, observée en microscopie optique (A) et électronique (B, C et D) à partir des inclusions en résine. GL : Gouttelette lipidique, Mb : Membrane, No : Noyau. Du matériel dense aux électrons est observé à la périphérie (indiqués par des flèches) ou à l'intérieur (indiqués par des trèfles) des gouttelettes lipidiques. Les étoiles représentent l'hétérogénéité de coloration.

**Tableau 28** : Dénombrement et caractéristiques morphologiques des gouttelettes lipidiques du foie gras avant cuisson, selon 5 classes d'aire. Les résultats sont présentés selon la comparaison 'Fonte faible' (n = 6) vs 'Fonte élevée' (n = 4) (moyenne ± écart-type). Les différences entre niveau de fonte de nombre de gouttelettes sont analysées selon le test du Khi 2, et celles d'indice de forme et de niveau de gris selon le test de Student.

	Fonte	< 320 µm <sup>2</sup>	320 - 640 µm <sup>2</sup>	640 - 1280 µm <sup>2</sup>	1280 - 2560 µm <sup>2</sup>	> 2560 µm <sup>2</sup>	
<b>Nombre</b>	Elevée	1136	217	73	23	5	<i>p</i> < 0,01
	Faible	1771	236	97	27	2	
<b>Indice de forme</b>	Elevée	0,677 ± 0,181	0,638 ± 0,207	0,488 ± 0,212	0,341 ± 0,148	0,142 ± 0,053	<i>p</i> < 0,01
	Faible	0,688 ± 0,168	0,688 ± 0,170	0,586 ± 0,200	0,343 ± 0,161	0,242 ± 0,125	
<b>Niveau de gris</b>	Elevée	119,4 ± 7,4	113,9 ± 6,2	116,4 ± 4,7	114,1 ± 5,4	117,5 ± 2,8	<i>p</i> < 0,01
	Faible	125,8 ± 12,1	120,2 ± 8,6	119,6 ± 8,7	122,0 ± 9,6	121,8 ± 6,7	

### *7.2.1. Morphologie des gouttelettes lipidiques avant la cuisson*

Les observations en microscopies optique (Figure 29 A) et électronique (Figures 29 B, C et D) du foie gras avant cuisson montraient des gouttelettes de petite taille, de forme sphérique, incluses dans une matrice non lipidique mais non entourée par une membrane (dans le sens d'une double couche phospholipidique) (Figure 29).

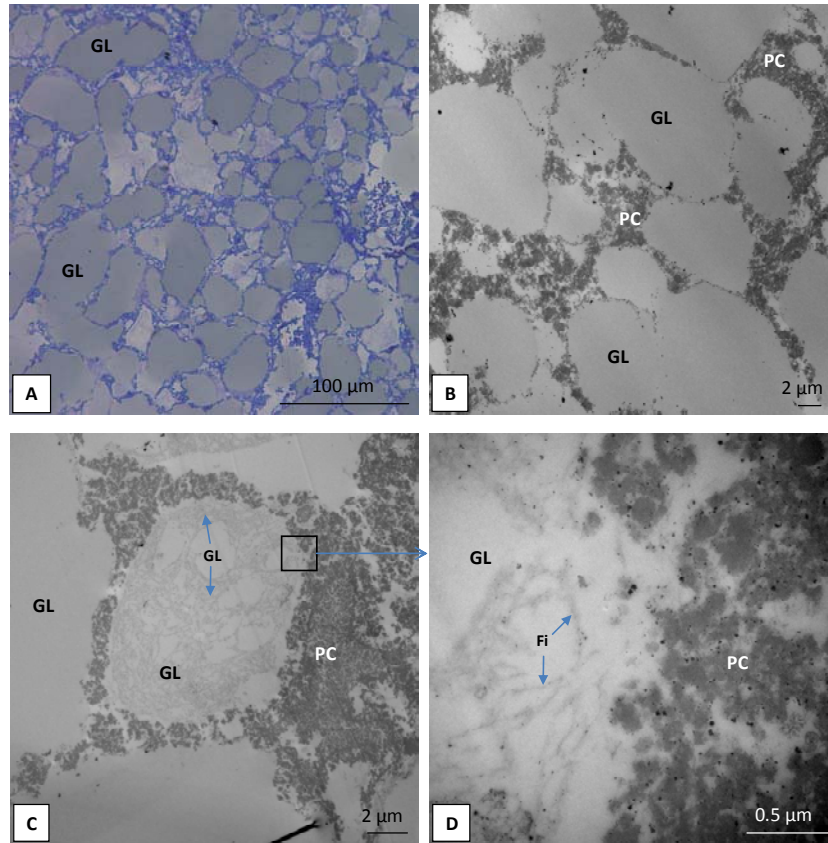
Ces observations révèlent une hétérogénéité de coloration des gouttelettes lipidiques, indiquées par des étoiles dans la figure 29 B, ainsi que du matériel dense aux électrons – indiqué par des trèfles - souvent localisé à la périphérie des gouttelettes. La figure 29 C montre des gouttelettes lipidiques probablement en cours de fusion, ce qui expliquerait que le matériel dense aux électrons puisse être observé à l'intérieur des gouttelettes de plus grande taille et de forme plus complexe (Figure 29 D).

L'analyse d'images a été réalisée à partir des observations en microscopie optique (Figure 16, Matériels et Méthodes). Au total, en prenant en compte l'ensemble des conditions de comparaison, nous avons pu détecter et discriminer plus de 8300 gouttelettes lipidiques.

Comme évoqué précédemment, les données ont été groupées par classes d'aire des gouttelettes lipidiques. De cette façon, cinq classes ont été définies avant cuisson et une sixième après cuisson. Les résultats du dénombrement, de l'indice de forme et de niveau de gris des gouttelettes par classe d'aire et selon le niveau de fonte sont présentés dans le tableau 28.

Les résultats du dénombrement indiquent que les gouttelettes lipidiques sont plus nombreuses et plus circulaires dans les foies gras présentant un niveau de fonte faible. En effet, l'indice de forme est compris entre 0 et 1, la valeur de 1 correspondant à un cercle parfait. Donc, plus l'indice de forme est élevé plus l'objet analysé est de forme circulaire.

De plus, nous avons mesuré le niveau de gris de chaque gouttelette lipidique à partir des images couleur converties en format 8 bits. Le niveau de gris s'étend de 0 – correspondant au noir – à 255 – correspondant au blanc. Il résulte de la fixation de l'acide osmique, utilisé dans la confection des inclusions en résine, sur les doubles liaisons des acides gras. Dans ce sens, il pourrait refléter le degré d'insaturation des lipides. Les résultats présentés dans le tableau 28 indiquent que les gouttelettes lipidiques des foies gras du groupe 'Fonte élevée', par rapport aux gouttelettes du groupe 'Fonte faible', montrent un niveau de gris plus faible et donc une coloration plus intense.

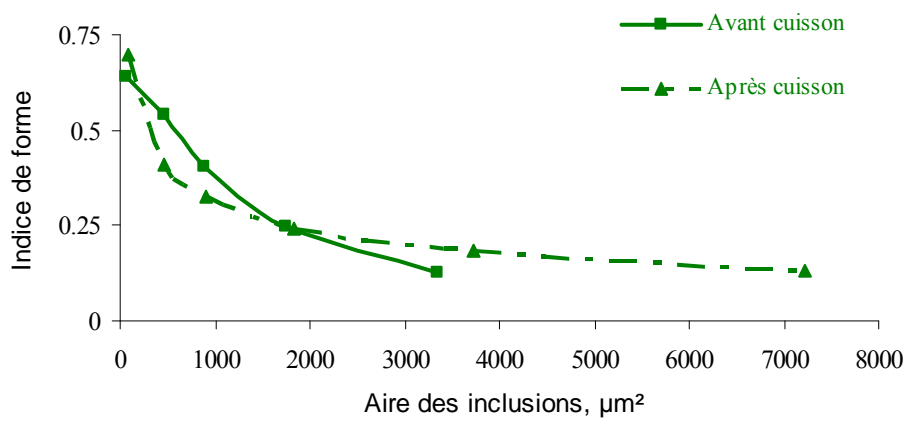


**Figure 30** : Morphologie des gouttelettes lipidiques de foie gras prélevé après cuisson, observée en microscopie optique (A) et électronique (B, C et D) à partir des inclusions en résine.

Fi : Filament, GL : Gouttelette lipidique, PC : Protéines Coagulées.

**Tableau 29** : Dénombrement et caractéristiques morphologiques des gouttelettes lipidiques du foie gras après cuisson, selon 6 classes d'aire. Les résultats sont présentés selon la comparaison 'Fonte faible' (n = 6) vs 'Fonte élevée' (n = 4) (moyenne ± écart-type) et comparés selon le test du Khi 2.

	Fonte	< 320 µm <sup>2</sup>	320 - 640 µm <sup>2</sup>	640 - 1280 µm <sup>2</sup>	1280 - 2560 µm <sup>2</sup>	2560 - 5120 µm <sup>2</sup>	> 5120 µm <sup>2</sup>	
Nombre	Elevée	466	65	48	23	22	26	NS
	Faible	336	58	33	21	19	11	
Indice de forme	Elevée	0,527 ± 0,198	0,469 ± 0,221	0,372 ± 0,207	0,255 ± 0,122	0,162 ± 0,070	0,109 ± 0,024	NS
	Faible	0,695 ± 0,211	0,409 ± 0,218	0,327 ± 0,204	0,243 ± 0,144	0,181 ± 0,076	0,133 ± 0,060	
Niveau de gris	Elevée	135,7 ± 12,8	128,9 ± 14,2	129,0 ± 15,0	132,7 ± 12,9	140,1 ± 10,2	151,0 ± 5,4	NS
	Faible	142,5 ± 13,4	142,3 ± 12,2	141,3 ± 13,0	147,0 ± 12,0	135,8 ± 12,1	136,4 ± 12,7	



**Figure 31 :** Relation entre l'indice de forme et l'aire des gouttelettes lipidiques (en  $\mu\text{m}^2$ ), avant et après cuisson, dans les foies gras du groupe 'Fonte faible'.



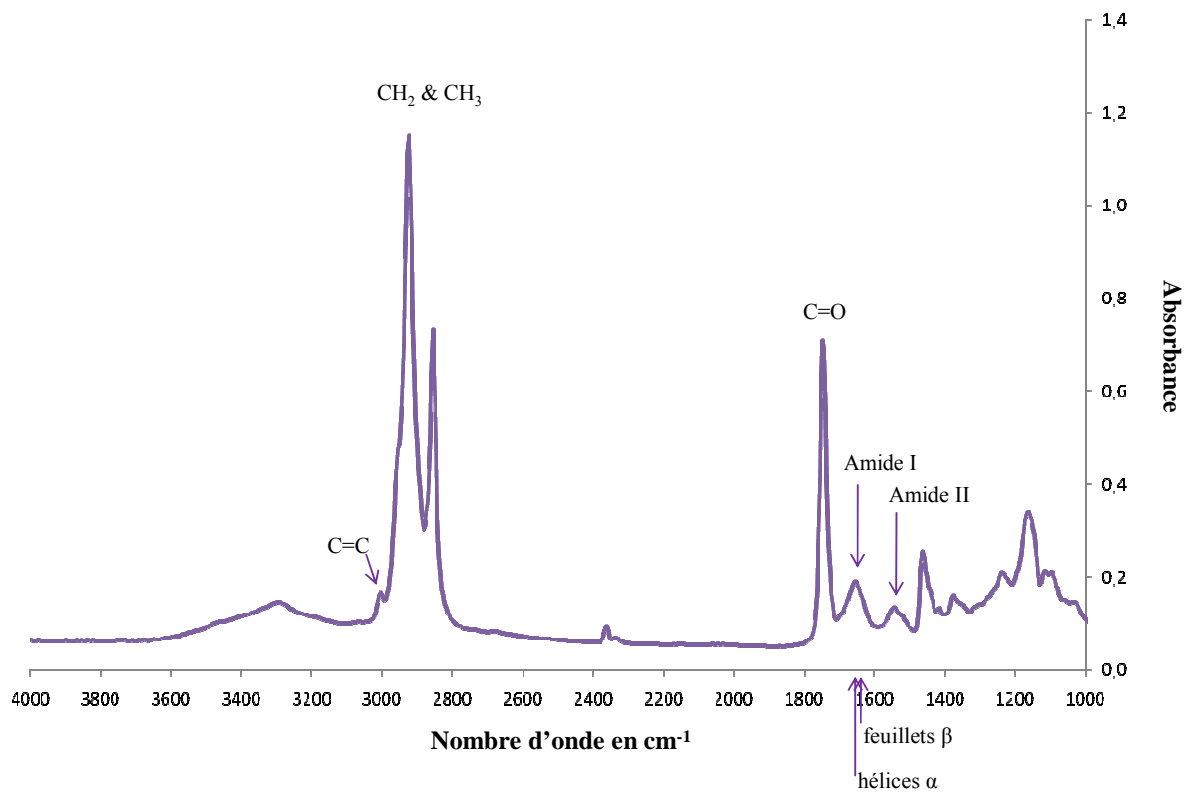
### *7.2.2. Morphologie des gouttelettes lipidiques après la cuisson*

Les observations en microscopies optique (Figure 30 A) et électronique (Figure 30 B, C et D) du foie gras après cuisson montraient des gouttelettes de grande taille, de forme complexe, incluses dans une matrice non lipidique constituée entre autre de protéines apparaissant coagulées (PC) (Figure 30). Dans certaines gouttelettes, nous pouvons observer des dépôts filamenteux (Fi) (Figure 30 C et D). Les différences d'intensité de coloration sont présentes également après cuisson comme le révèlent les observations en microscopies optique et électronique.

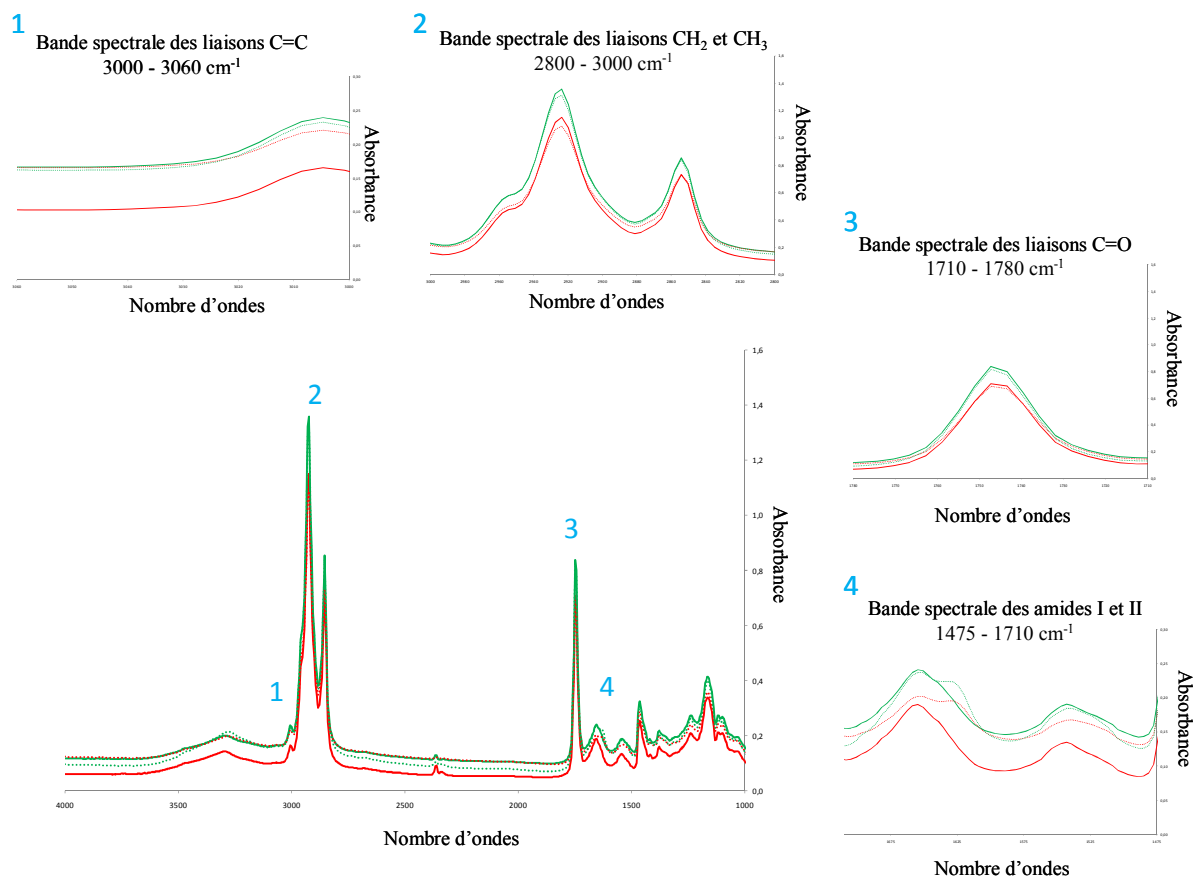
L'analyse des caractéristiques des gouttelettes lipidiques après cuisson en fonction du niveau de fonte (Tableau 29) ne révèle pas de différences concernant le nombre, l'indice de forme ou le niveau de gris selon le niveau de fonte à la cuisson. Le traitement thermique semble avoir le même impact dans les deux groupes de comparaison. Néanmoins, nous pouvons observer une diminution du nombre de gouttelettes après cuisson et plus particulièrement des plus petites. L'apparition d'une classe spécifique des foies gras cuits est très probablement due à la fusion de plus petites inclusions sous l'effet du traitement thermique. Le résultat est la formation de larges gouttelettes ayant perdu leur sphéricité. De plus, dans la classe spécifique de l'état cuit, les gouttelettes de grande taille sont plus nombreuses dans les foies gras présentant un niveau de fonte élevée.

De plus, la relation entre l'indice de forme et l'aire des gouttelettes (Figure 31) montre que plus les gouttelettes sont grandes, moins elles sont circulaires. Ceci est vrai avant et après cuisson, quel que soit le niveau de fonte à la cuisson.

L'étude de la morphologie des gouttelettes lipidiques a été effectuée dans le cadre du premier volet du projet. Dans le second volet, nous avons cherché à valider les hypothèses relatives aux fusions des gouttelettes lipidiques : le lien entre le degré d'insaturation des acides gras et la propension des gouttelettes à fusionner, ou encore une dénaturation protéique de la matrice entourant les gouttelettes favorisant la fusion de celles-ci. Pour cela, nous avons appliqué des méthodes de microspectroscopies Ultra-Violet (UV) en rayonnement synchrotron et Infra-Rouge (IR) en source interne.



**Figure 32** : Spectre moyen prétraité de foie gras cru obtenu en FTIR. Chaque pic, pour un nombre d'onde donné, correspond à la vibration d'un type de liaison chimique ; les principales liaisons chimiques sont indiquées sur la figure.



**Figure 33** : Exemples de spectres moyens obtenus en microspectroscopie FTIR. Ces spectres ont été acquis à partir de foies gras crus (en trait plein) et cuits (en pointillés) ; des groupes 'Fonte faible' (représenté en vert) et 'Fonte élevée' (représenté en rouge).

## 7.3. Caractérisation du foie gras en microspectroscopies infrarouge et ultra-violet

### *7.3.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier*

La microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR pour Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) a été utilisée pour l'analyse de coupes de foies gras crus et cuits. L'objectif était la caractérisation à l'échelle moléculaire du foie gras, reliée à son évolution au cours de la cuisson et en lien avec le niveau de fonte à la cuisson.

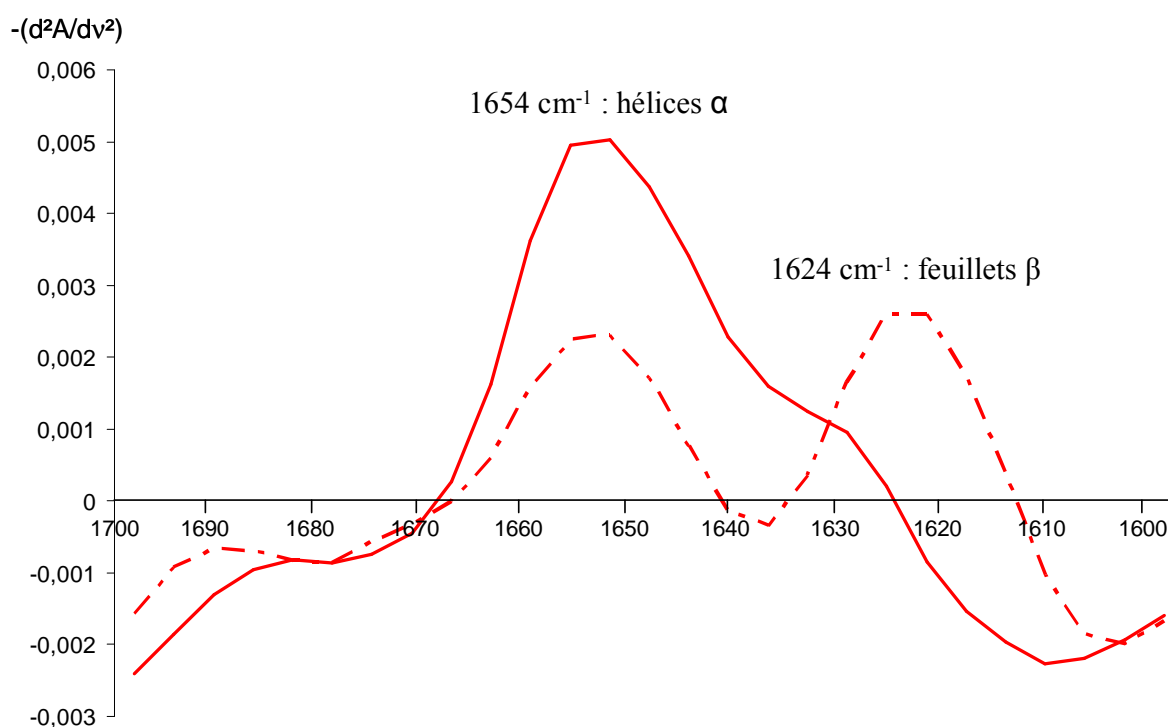
L'acquisition des spectres a été réalisée sur l'ensemble de la coupe. Après prétraitement des données spectrales, nous obtenons un spectre où chaque pic correspond à la vibration d'une liaison chimique en particulier (Figure 32).

#### 7.3.1.1. Profils des bandes spectrales d'intérêt de foies gras crus et cuits

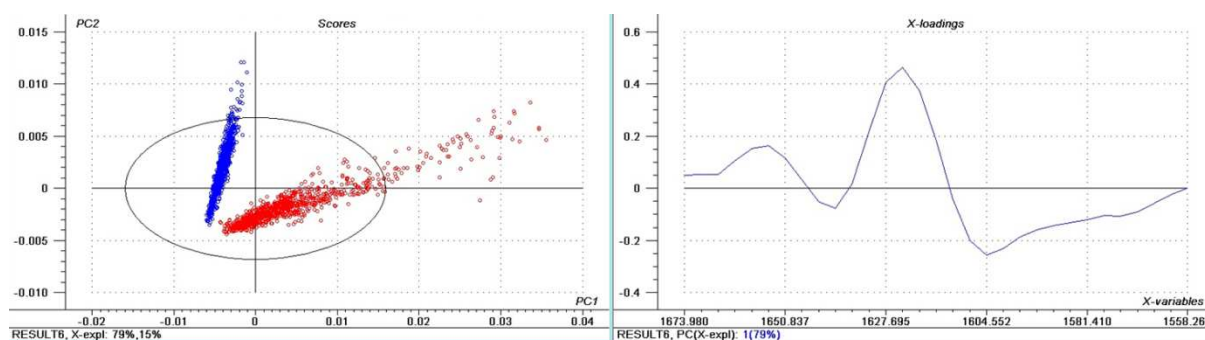
En première approche, nous avons choisi de travailler sur les principales bandes spectrales présentées dans la figure 32. L'analyse des bandes spectrales des amides I et II ( $1475 - 1710 \text{ cm}^{-1}$ ) permet d'acquérir des informations sur la structure des protéines. La bande spectrale des liaisons chimiques C=O des esters ( $1710 - 1780 \text{ cm}^{-1}$ ) apporte des informations notamment sur les triglycérides. La bande spectrale comprise entre  $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  correspond aux liaisons chimiques  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des chaînes aliphatiques carbonées des lipides. Cette bande spectrale comporte deux principaux pics comme indiqué dans le spectre moyen prétraité, et d'autres minoritaires. La bande spectrale comprise entre  $3000 - 3060 \text{ cm}^{-1}$  renseigne sur le degré d'insaturation des chaînes aliphatiques des lipides grâce à la vibration caractéristique de la liaison chimique C=C.

Nous avons acquis des spectres à partir de coupes de foies gras crus et cuits, des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée'. Des exemples de spectres moyens acquis dans la bande spectrale des amides I et II sont représentés dans la figure 33.

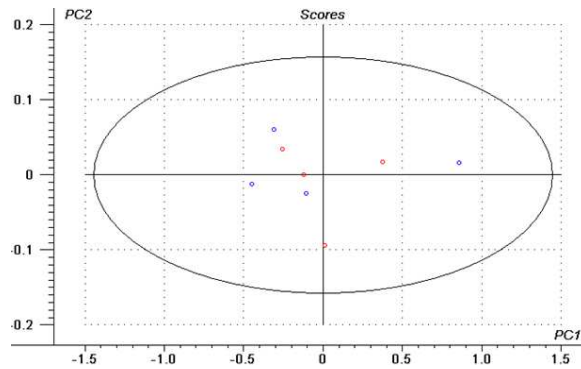
Au sein de chaque groupe de fonte, les spectres moyens des foies gras crus et cuits présentent le même profil général concernant les bandes spectrales des amides I et II, des liaisons C=O des esters, des liaisons  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des chaînes aliphatiques ou encore des liaisons C=C ; quel que soit le niveau de fonte à la cuisson. Toutefois, après cuisson, des variations spectrales caractéristiques d'une évolution de la structure secondaire des protéines



**Figure 34** : Spectres FTIR en dérivée seconde des bandes spectrales des amides I et II, de foies gras cru (en trait plein) et cuit (en pointillés) du groupe 'Fonte faible'.



**Figure 35** : Analyse en composante principale réalisée à partir des données de la bande spectrale des amides I ( $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) des spectres FTIR de foies gras crus (bleu) et cuits (rouge).



**Figure 36** : Analyse en composante principale réalisée à partir des données de la bande spectrale des amides I et II ( $1710 - 1475 \text{ cm}^{-1}$ ) des spectres FTIR de foies gras crus. Les échantillons du groupe 'Fonte faible' sont représentés en bleu et ceux du groupe 'Fonte élevée' sont représentés en rouge.

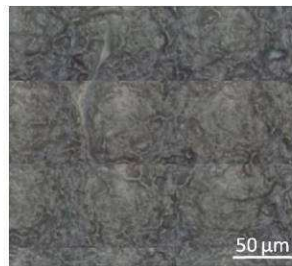
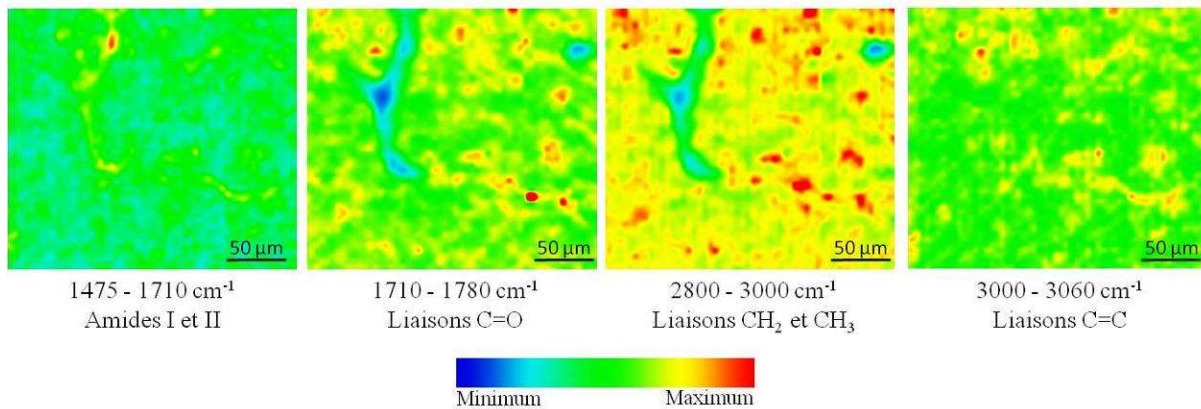


Image optique de la zone d'analyse



**Figure 37** : Reconstitution d'images spectrales à partir de l'acquisition en optique sur une coupe de foie gras cru du groupe 'Fonte faible', en fonction de l'intensité des différentes bandes spectrales : des amides I et II ( $1710 - 1475 \text{ cm}^{-1}$ ), des liaisons C=O des esters ( $1780 - 1710 \text{ cm}^{-1}$ ), des liaisons  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des chaînes aliphatiques ( $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ ), et des liaisons C=C des chaînes aliphatiques insaturées ( $3060 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ).

sont observées au niveau de la bande des amides I. Le spectre en dérivée seconde (Figure 34) confirme ce résultat et met en évidence une diminution du taux d'hélices  $\alpha$  et une augmentation du taux de feuillets  $\beta$  à la suite du traitement thermique.

L'analyse des données par ACP (Figure 35) confirme un effet de la cuisson sur les bandes spectrales correspondant aux feuillets  $\beta$  et aux hélices  $\alpha$ , qui traduit une dénaturation des protéines du foie gras au cours du traitement thermique.

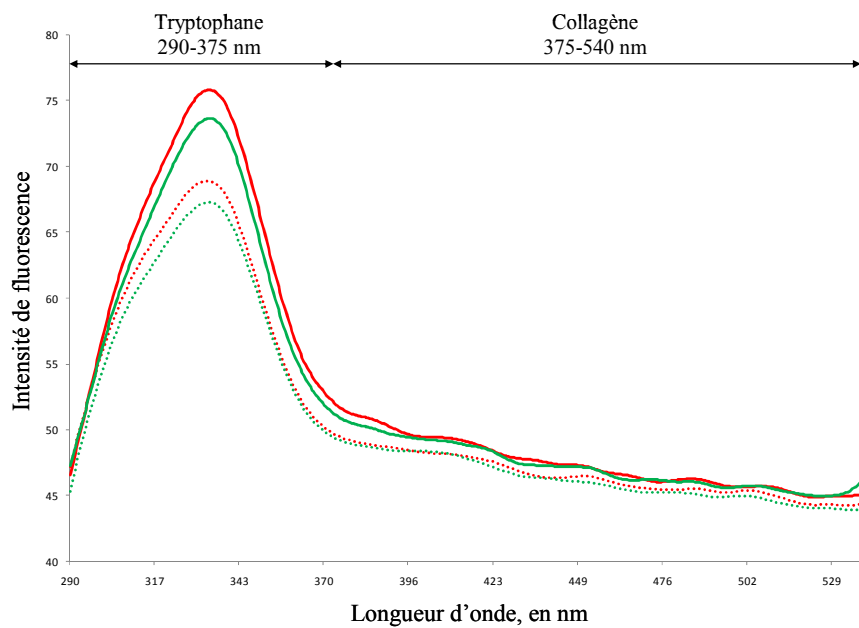
Pour déterminer si les profils moyens obtenus nous permettaient de relier la fonte lipidique à la cuisson avec l'intensité des bandes spectrales d'intérêt, nous avons réalisé des ACP. Quelle que soit la bande spectrale considérée, avant et après cuisson, les analyses n'ont pas permis de séparer correctement les individus des deux groupes (Figure 36).

Les premiers résultats obtenus à partir des spectres FTIR moyens par échantillon ne mettent pas en évidence de lien entre la fonte lipidique à la cuisson et les bandes spectrales d'intérêt. Il s'agit là de résultats préliminaires, et des analyses plus poussées prenant en compte la résolution spatiale par l'intégration de plusieurs spectres par échantillon sont en cours.

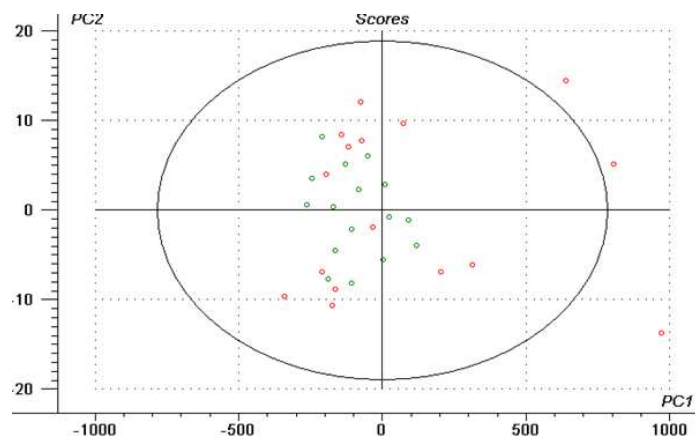
#### 7.3.1.2. Cartographie des bandes spectrales FTIR d'intérêt

L'intégration des données spectrales selon la localisation sur la coupe permet de reconstituer des images spectrales des groupes chimiques et molécules d'intérêt (Figure 37).

La comparaison des cartographies spectrales apporte des informations relatives à la co-localisation et la répartition des liaisons chimiques, et donc des molécules, étudiées en FTIR. Dans un premier temps, il apparaît que les protéines, représentées indirectement par les groupements amides I et II, ne sont pas co-localisées avec les lipides, et leur répartition sur la coupe est minoritaire face à la prépondérance des lipides. En effet, la représentation selon la bande spectrale des liaisons chimiques  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des chaînes aliphatiques des lipides et celle des liaisons  $\text{C}=\text{O}$  des esters montrent des répartitions relativement homogènes sur la coupe de foie gras cru, avec certaines zones plus riches, représentées dans les tons de rouge. Enfin, la représentation de la bande spectrale des liaisons chimiques  $\text{C}=\text{C}$ , indicateur du degré d'insaturation des lipides, montre une répartition plus localisée. Toutefois, la localisation de la bande spectrale des liaisons chimiques  $\text{C}=\text{C}$  reste cohérente puisque superposée à celle des liaisons chimiques  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des chaînes aliphatiques des lipides.



**Figure 38** : Exemples de spectres moyens obtenus en UV en rayonnement synchrotron, exprimés en intensité de fluorescence. Ces spectres ont été acquis à partir de foies gras crus (en trait plein) et cuits (en pointillés) ; des groupes ‘Fonte faible’ (représenté en vert) et ‘Fonte élevée’ (représenté en rouge).



**Figure 39** : Analyse en composantes principales obtenues à partir des données spectrales UV du tryptophane (290-375 nm) des foies gras crus du groupe ‘Fonte faible’ représentés en vert, et du groupe ‘Fonte élevée’ représentés en rouge.



## *7.3.2. Microspectroscopie Ultraviolet en rayonnement synchrotron*

### 7.3.2.1. Profils des spectres UV de foies gras crus et cuits

La microspectroscopie UV en rayonnement synchrotron a été appliquée aux échantillons de foies gras crus et cuits, des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée'. Les spectres acquis permettent l'étude du tryptophane et, dans une moindre mesure, du collagène, grâce à l'autofluorescence de ces composés. Les spectres moyens des foies gras crus et cuits, des deux groupes de fonte sont représentés dans la figure 38.

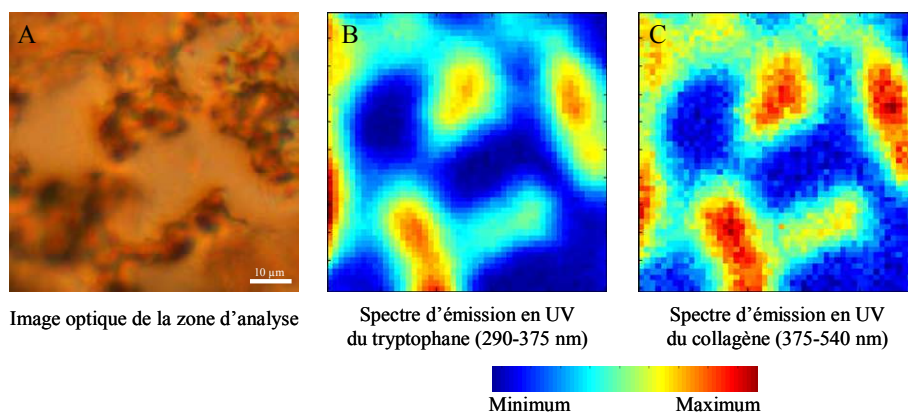
Globalement, les spectres moyens du groupe 'Fonte élevée' présentent une intensité de fluorescence supérieure à ceux du groupe 'Fonte faible', que ce soit avant ou après cuisson. De plus, au sein de chaque niveau de fonte, le profil des spectres de foies gras cuits est moins intense que celui des foies gras crus.

Pour déterminer si les profils moyens obtenus nous permettaient de relier la fonte lipidique à la cuisson avec le spectre UV du tryptophane ou du collagène, nous avons réalisé des ACP. Quel que soit le composé considéré, et avant et après cuisson, les analyses n'ont pas permis de séparer correctement les individus des deux groupes (Exemple d'ACP dans la figure 39).

Les premiers résultats obtenus à partir des bandes spectrales d'intérêt moyen par échantillon ne mettent pas en évidence de lien entre la fonte lipidique à la cuisson et les spectres moyens. Il s'agit là encore de résultats préliminaires, et des analyses plus poussées prenant en compte la répartition par l'intégration de plusieurs spectres par échantillon sont en cours.

### 7.3.2.2. Cartographie des bandes spectrales UV d'intérêt

L'intégration des données spectrales selon la localisation sur la coupe permet de reconstituer des images spectrales représentant la localisation des molécules d'intérêt selon leur intensité exprimée en unité arbitraire (Figure 40).



**Figure 40** : Reconstitution d'images spectrales à partir d'une coupe de foie gras cuit du groupe 'Fonte faible', en fonction de l'intensité des différents composés : le tryptophane (290-375 nm) et le collagène (375-540 nm).

L'application de la microspectroscopie UV en rayonnement synchrotron à l'étude des caractéristiques du foie gras confirme la présence de collagène localisé en principe dans l'espace extra-cellulaire.

En comparant les cartographies spectrales, il est apparu une co-localisation du tryptophane et du collagène, même si ce dernier montre une localisation plus large dans le tissu. Les échelles sont automatiques et ne sont pas équivalentes entre ces deux images ; il est important de se rapporter au spectre moyen qui indique une faible représentativité du collagène dans les foies gras de canard cru et cuit.

En conclusion, l'approche histologique du déterminisme biologique de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard a permis des observations à différentes échelles. Les méthodes employées sont complémentaires en ce sens, mais également par les informations que chacune d'entre elles apportent. Des liens entre la qualité technologique du foie gras et les caractéristiques de structure du tissu et de la morphologie des gouttelettes lipidiques ont été mis en évidence. Dans le second volet, nous avons cherché à valider ces résultats par l'infirmer ou la confirmation des hypothèses émises, grâce à des méthodes permettant une résolution spatiale et spectrale très importante. La quantité et la complexité des données acquises nous ont conduits à présenter ici une première approche, basée sur les données moyennes. La perspective de ce travail à court terme est d'affiner les analyses, notamment en prenant bien en compte la résolution spatiale et l'ensemble des informations contenues respectivement dans les spectres FTIR et UV.

# *DISCUSSION*

Dans cette partie, la discussion portera sur les résultats précédemment présentés, mais également ceux acquis plus largement dans le cadre du projet 'Fonte' dans lequel s'inscrit ce travail de thèse. En effet, une étude métabolomique a fait l'objet d'un stage de Master 2 Recherche dans le laboratoire (Aurélié Guerra), en collaboration avec la plateforme de métabolomique de Toulouse. L'évolution *post mortem* du profil métabolomique de la fraction hydrophile du foie gras cru a été étudiée par Résonance Magnétique Nucléaire  $^1\text{H}$  (RMN), en relation avec le niveau de fonte lipidique.

La discussion sera développée en regard de la bibliographie disponible sur le sujet, mais également en parallèle de ce qui a pu être observé dans le cas de stéatose humaine non alcoolique (NAFLD pour 'Non Alcoholic Fatty Liver Disease'). En effet, certaines des méthodes utilisées dans ce projet sont pionnières dans le domaine agro-alimentaire du foie gras, et la NAFLD constitue l'élément de comparaison le plus proche de la stéatose hépatique alimentaire des palmipèdes.

### **Caractérisation biochimique des foies gras**

La caractérisation biochimique des foies gras de canard consistait à mesurer les teneurs des principaux constituants. En complément, nous avons cherché à confirmer les résultats obtenus en protéomique concernant l'expression de protéines impliquées dans le stress oxydatif ou encore dans le métabolisme glucidique. Pour cela, les statuts oxydants des protéines et des lipides ont été évalués, ainsi que les teneurs en acide lactique et en glycogène.

Concernant la composition biochimique élémentaire des foies gras, les résultats obtenus sont conformes à ce qui a pu être observé dans de précédentes études, en termes de poids de foie, de teneurs en lipides et protéines (Molee *et al.*, 2005, Marie-Etancelin *et al.*, 2010, Bax *et al.*, 2011) et en collagène (Marie-Etancelin *et al.*, 2010). Les groupes de comparaison 'Fonte faible' et 'Fonte élevée' ont été constitués de sorte à présenter des poids de foie et des taux d'engraissement équivalents. Les résultats statistiques confirment l'absence de différence entre les deux groupes. La mesure de la teneur en collagène avait pour objectif de déterminer le rôle de celui-ci dans le phénomène de fonte lipidique à la cuisson. Les résultats biochimiques ont également été mis en relation avec les résultats acquis en immuno-marquage. Ces deux approches n'ont pas permis d'impliquer le collagène dans le phénomène de fonte.

De façon à compléter l'approche biochimique et confirmer les résultats acquis en protéomique, le statut oxydant des protéines et des lipides du foie gras de canard a été évalué par dosage colorimétrique (Tableau 12). Qu'il s'agisse de l'oxydation des lipides ou des protéines, les résultats montrent un statut oxydant équivalent entre niveaux de fonte. Une étude a mesuré ces mêmes paramètres en employant les mêmes méthodes sur du foie de rat présentant une stéatose induite par un régime riche en graisse (Ciapaite *et al.*, 2011). La comparaison de nos résultats avec ceux de cette étude montre que chez le canard, l'oxydation des lipides est moins importante que chez le rat ; à l'inverse l'oxydation des protéines montre des valeurs supérieures. La teneur en lipides des foies de rat n'est pas disponible, mais les observations histologiques après coloration des lipides au Red Oil indiquent un engraissement moindre que dans le cas de foie gras de canard, avec notamment des zones sans gouttelettes lipidiques. Un niveau d'engraissement plus ou moins important dans les foies de canard et de rat pourrait expliquer des différences d'oxydation mesurées entre les deux études. Quoiqu'il en soit, il a été évoqué par certains auteurs un manque de sensibilité et de spécificité de ces méthodes d'évaluation d'oxydation, que ce soit la méthode par la détection des TBARS (Jo et Ahn, 1999), ou celle par la détection des groupements carbonyles (Shacter, 2000). Ainsi, il serait sans doute intéressant d'appliquer des méthodes plus fines, comme par exemple de l'immunodétection (Shacter, 2000), pour étudier avec plus de précision le statut oxydant dans le foie gras de canard.

Dans l'objectif de confirmer la différence de métabolisme glucidique entre les deux niveaux de fonte mise en évidence en protéomique, nous avons mesuré la teneur en glycogène et acide lactique. Dans le premier volet, les résultats mettaient en relation une dégradation du rendement technologique avec une teneur en glycogène hépatique à 6 heures *post mortem* moindre. Ce résultat confirme ce qui a pu être observé chez l'oie, où une augmentation de la fonte lipidique à la cuisson a été mise en relation avec une moindre quantité de glycogène (Bouillier-Oudot *et al.*, 2004), mais il n'a pas été validé dans le second volet. De plus, dans la seconde expérimentation, nous avons observé une diminution de la teneur en glycogène entre 20 minutes et 6 heures *post mortem*. Cette évolution est équivalente entre les deux niveaux de fonte et elle est cohérente avec des résultats obtenus en métabolomique par approche RMN, où il a été démontré une augmentation du glucose au cours de la réfrigération (Guerra, 2011). L'augmentation du glucose pourrait éventuellement être expliquée par une glycogénolyse, le glycogène étant stocké en quantité importante dans le foie.

En ce qui concerne la caractérisation de la fraction lipidique des foies gras, l'examen de la littérature a démontré l'absence de lien entre le profil en acides gras totaux et la fonte lipidique (Cazeils, 2000). Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement au profil des lipides neutres et des triglycérides. La première hypothèse portait sur une répartition différente des classes de lipides neutres selon le niveau de fonte à la cuisson. Ensuite, les triglycérides représentant environ 98% des lipides neutres, nous avons procédé à une analyse plus en détail de ces composés en effectuant le profil selon les types d'acides gras estérifiant le glycerol. Nous avons émis l'hypothèse que des points de fusion différents de ces acides gras et de leur agencement au niveau des triglycérides pouvaient influencer la fonte lipidique à la cuisson. La composition hépatique en lipides neutres du foie gras de canard est globalement cohérente avec ce qui a pu être observé chez l'oie (Bouillier-Oudot *et al.*, 2004), à l'exception des acides gras libres qui n'avaient pas été détectés lors de l'analyse des foies gras d'oie. Ensuite, la composition hépatique en triglycérides montre un profil global équivalent entre les deux niveaux de fonte ; seul le palmitoleyl 1, di-oleyl 2,3-glycerol (PoOO) présente une teneur plus importante dans le groupe 'Fonte faible'. Les acides palmitoléique (C16:1) et oléique (C18:1) constituant le PoOO se situent en début de la chaîne de synthèse des acides gras (Figure 4). Aussi, il nous est difficile de conclure à partir de ce résultat sur l'implication d'un type préférentiel de saturase ou d'élongase dans la fonte lipidique à la cuisson. Globalement, cette approche n'a pas permis de relier la fonte lipidique à la cuisson avec la répartition des triglycérides. Néanmoins, dans le cadre du projet, des données sont en cours d'acquisition sur le profil en lipides neutres et en triglycérides des foies gras cuits. Ainsi, les résultats devraient nous permettre de statuer si la fonte lipidique à la cuisson est reliée à un type préférentiel de lipides ou de triglycérides plus susceptibles de participer à la fonte à la cuisson.

En conclusion, l'approche biochimique, et plus particulièrement l'étude de la fraction lipidique, ne permet pas de faire émerger des hypothèses sur les mécanismes à l'origine de la fonte lipidique. En particulier, l'hypothèse selon laquelle une fonte supérieure pourrait être liée à une composition différente, caractérisée par des lipides à plus faible point de fusion, et donc plus « mobile » au cours du chauffage, n'est pas confirmée.

Nos travaux nous ont donc conduits à orienter les recherches vers la fraction protéique sur laquelle très peu d'informations sont disponibles dans la littérature.

## **Analyse de l'expression des protéines du foie gras en relation avec le niveau de fonte lipidique à la cuisson.**

Les hypothèses à l'origine de cette approche portaient sur l'implication notamment de protéines du métabolisme et/ou de protéines membranaires dans les mécanismes de fonte lipidique. Ces protéines présentent des propriétés de solubilité différentes, aussi il a été nécessaire d'adapter les méthodes de séparation à chacune d'entre-elles (Figure 11). L'objectif de cette approche fractionnée était d'obtenir la meilleure résolution possible de séparation, et donc d'analyser, des protéines en fonction de leur propriétés.

Dans l'étude de la fraction protéique soluble à faible force ionique, nous avons utilisé l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (E2D-MS) pour l'identification des spots d'intérêt. La résolution des spots sur nos gels résulte d'une séparation en première et seconde dimension efficace qui permet une bonne définition des protéines d'intérêt. La forte représentativité des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique confirme la pertinence de cette méthode pour l'étude de la fraction considérée.

Dans l'étude de la fraction protéique non soluble à faible force ionique, nous avons utilisé la stratégie 'Shot-Gun' qui consiste à séparer les protéines selon leur poids moléculaire, à identifier l'ensemble des protéines présentes et ensuite à comparer leur expression en fonction du facteur de comparaison. Cette méthode limite les étapes critiques pour l'analyse des protéines hydrophobes (telle que l'isoélectrofocalisation). La fraction protéique visée par cette approche concernait les protéines membranaires. Même si les résultats n'ont pas montré de lien entre la fonte lipidique à la cuisson et l'expression de ce type de protéines, cette méthode a permis l'identification de certaines protéines membranaires, dont l'expression était équivalente entre les niveaux de fonte. La présence de ce type de protéines dans la fraction étudiée, le large spectre de protéines identifiées notamment en termes de compartiment cellulaire, ainsi que la quantité de données acquises dans le domaine, confirme la pertinence de l'utilisation de cette méthode. Toutefois, il serait intéressant d'employer cette méthode à l'étude de la fraction soluble à faible force ionique, et ainsi compléter l'approche E2D-MS et obtenir un profil plus exhaustif de cette fraction.

L'analyse des données obtenues en protéomique a été réalisée en deux parties, de la même façon dans chaque fraction protéique. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la relation entre le niveau de fonte lipidique à la cuisson et l'expression des protéines à 20



minutes *post mortem*. En effet, nous avons émis l'hypothèse qu'à ce stade le protéome était très proche de celui que nous pourrions observer *in vivo*. Dans un second temps, au sein de chaque groupe de fonte, nous avons étudié l'évolution de l'expression des protéines au cours du refroidissement en comparant les profils à 20 minutes et à 6 heures *post mortem*. L'objectif était d'étudier l'évolution du tissu après la mort de l'animal, au cours du refroidissement, notamment en termes d'activités enzymatiques résiduelles impliquées par ailleurs dans l'établissement des qualités technologiques de la viande (Morzel *et al.*, 2006b).

#### *Expression des protéines à 20 minutes post mortem*

Dans la fraction protéique soluble à faible force ionique, l'analyse a permis de relier la fonte lipidique à la cuisson à l'expression de 47 spots. Parmi eux, seuls 13 ont pu être identifiés par spectrométrie de masse (Tableau 16). Le génome du canard n'est pas encore séquencé, les identifications sont donc obtenues par comparaison des spectres de spectrométrie de masse avec les bases de données *Gallus gallus*, et grâce à une base de données privées (fournie par A. Vignal, LGC-INRA). Malgré cela, le taux d'identification reste faible mais les résultats font tout de même émerger des différences nettes entre les deux niveaux de fonte. Ainsi, pour la suite de l'exposé, les protéines identifiées ont été classées par fonction biologique.

Parmi les protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, trois sont seulement détectées dans le groupe 'Fonte faible' et sont impliquées dans la glycolyse et la gluconéogenèse : la triose phosphate isomérase (spot 302), l'alpha émolase 1 (spot 100) et la malate déshydrogénase (spot 138). Une protéine seulement détectée dans le groupe 'Fonte élevée' est impliquée dans le métabolisme énergétique des lipides, il s'agit de la 'fatty acid binding protein 4' (spot 304). Afin de valider l'implication du métabolisme glucidique, nous avons mesuré la teneur en glycogène et en acide lactique dans les deux groupes de fonte, sur des foies gras prélevés à 6 heures *post mortem* dans le premier volet (Tableau 13). Les résultats indiquent une teneur en acide lactique équivalente entre les deux groupes, mais une teneur en glycogène supérieure dans le groupe 'Fonte faible'. Ce résultat n'a pu être confirmé dans le second volet, où nous avons trouvé des valeurs très similaires entre les deux niveaux de fonte. Il semblerait néanmoins que dans les foies gras du groupe 'Fonte faible', le métabolisme glycolytique est toujours actif, contrairement aux foies du groupe 'Fonte élevée' dans lesquels les réserves énergétiques tendent à s'épuiser. De plus, en fin de gavage, un métabolisme énergétique lipidique plus accru a été démontré par expression génique chez le

canard (Hérault *et al.*, 2009) et l'oie (Zhu *et al.*, 2011), ou par analyse protéomique chez le canard (Bax *et al.*, 2011). A l'inverse, chez l'oie, le gavage inhibe l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse (Zhu *et al.*, 2011). Nos résultats montrent globalement une surexpression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, cohérente avec l'effet positif du gavage sur les activités métaboliques énergétiques. Cela suggère que les foies gras présentant un faible niveau de fonte sont, au moment de l'abattage, toujours dans un processus de synthèse et de stockage des lipides. De plus, nos résultats indiquent que la FABP4 était uniquement détectée dans le groupe 'Fonte élevée'. L'expression du gène codant pour cette protéine est reliée à la teneur en lipides de foies humains présentant une stéatose hépatique non alcoolique (Greco *et al.*, 2008). Dans la mesure où nos groupes de comparaison ont été constitués pour présenter des taux d'engraissement équivalents, nous ne pouvons corrélérer l'expression des protéines avec ce paramètre. Mais à la lumière de l'expression de cette protéine dans un cas pathologique chez l'humain, nous émettons l'hypothèse que la détection de la protéine FABP4 uniquement dans le groupe 'Fonte élevée' pourrait être le signe d'un mécanisme de protection cellulaire du foie. La sous-unité beta de l'ATP synthase (spot 95) a également été identifiée uniquement dans le groupe 'Fonte faible'. Ce résultat pourrait refléter une production d'énergie plus importante dans ce groupe, ce qui confirmerait les résultats acquis sur le métabolisme énergétique.

Les quatre protéines impliquées dans les processus d'oxydo-réduction dont l'expression à 20 minutes *post mortem* est reliée à la fonte lipidique sont présentes dans les deux groupes de fonte. Trois d'entre elles sont surexprimées dans le groupe 'Fonte élevée', et une dans le groupe 'Fonte faible'. Pour compléter ce résultat, nous avons mesuré le statut oxydant des protéines et des lipides du foie gras (Tableau 12). Dans les deux cas, et dans les deux volets du projet, les résultats biochimiques sont équivalents entre niveaux de fonte. Globalement, en cas de stéatose hépatique, l'accumulation de lipides dans le foie induit la production d'espèces réactives à l'oxygène conduisant à un stress oxydatif (Apel et Hirt, 2004). L'expression de protéines impliquées dans des processus d'oxydo-réduction se retrouve dans les deux groupes de fonte. Mais dans le cas d'un niveau élevé de fonte lipidique à la cuisson, il semble que la réponse en termes d'expression des protéines au stress oxydatif soit plus importante. En effet, nous avons mesuré les corrélations entre le rendement technologique et l'intensité des spots d'intérêt. L'intensité de la protéine Prdx3 (spot 168) montre une corrélation de -0.67 ( $p=0,03$ ), la protéine SOD 1 (spot 194) montre une

corrélation de  $-0.62$  ( $p=0,07$ ) et l'aldéhyde déshydrogénase 2 (spot 86) montre une corrélation de  $-0.59$  ( $p=0,07$ ). Les intensités de ces trois spots surexprimés dans le groupe 'Fonte élevée' sont négativement corrélées avec le rendement technologique, renforçant notre hypothèse d'un stress oxydatif plus important dans ce groupe. Ces résultats indiquent en effet que plus ces protéines sont exprimées, plus le rendement technologique est faible et donc plus la fonte lipidique à la cuisson est importante.

Une protéine impliquée dans l'homéostasie calcique a été détectée uniquement dans le groupe 'Fonte faible'. La régucalcine est impliquée dans de nombreux processus biologiques (pour revue, Yamaguchi, 2000), aussi il est difficile de déterminer quel rôle cette protéine peut avoir dans les mécanismes de fonte lipidique à la cuisson. Néanmoins, il a été démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm de cette protéine au cours de la régénération des foies de rat après hépatectomie (Yamaguchi et Kanayama, 1995), ainsi qu'une surexpression du gène chez des souris knock-out pour le gène STAT6 (pour 'Signal Transducer and Activator of Transcription') qui présentent des teneurs hépatiques en lipides supérieurs aux animaux témoins (Iff *et al.*, 2009). Ces résultats nous permettent de renforcer l'hypothèse d'un état de stéatose avancé par la mise en place de mécanismes de protection cellulaire dans le groupe 'Fonte élevée'. Ces mécanismes, susceptibles de se développer en fin de gavage, pourraient expliquer la surexpression de la régucalcine en fin de gavage de canards mulards (Bax *et al.*, 2011).

Seule une protéine à activité protéolytique a été identifiée dans cette partie de l'étude : il s'agit de la prépro cathepsine D (spot 188) qui a été détectée uniquement dans le groupe 'Fonte faible'. Dans la mesure où seulement une protéine de ce groupe fonctionnel a été identifiée, et qu'il s'agit d'une forme inactive, il est difficile, à partir de ce résultat, de relier la fonte lipidique au profil protéolytique.

Enfin, l'agmatinase (spot 242) présentait une surexpression dans le groupe 'Fonte élevée'. Dans une analyse protéomique de foie de souris présentant une stéatose hépatique induite par un régime riche en lipides, l'agmatinase présentait une surexpression chez ces individus (Kirpich *et al.*, 2010). Dans la même étude, des observations histologiques révèlent que les souris ont développé une stéatose macrovacuolaire sans présence de nécrose, inflammation ou fibrose. Ceci confirmerait l'état de stéatose plus avancé des animaux du

groupe 'Fonte élevée', sans pour autant que leur état ne soit pathologique, comme cela a été observé chez la souris.

Dans la fraction non soluble à faible force ionique, l'application de la stratégie 'Shot-Gun' a permis la détection et l'identification de 615 groupes de protéines. La comparaison des groupes de protéines entre les niveaux de fonte a montré que 70 groupes de protéines étaient spécifiques du groupe 'Fonte faible' (Tableau 19) et 71 spécifiques du groupe 'Fonte élevée' (Tableau 20). Dans la mesure où nous travaillons sur une comparaison d'échantillons combinant les individus des groupes 'Fonte faible' et 'Fonte élevée', nous avons pensé que, dans un premier temps, il serait plus pertinent de travailler sur les protéines spécifiques de chacun des groupes, à 20 minutes *post mortem*.

Dans le groupe 'Fonte élevée', la comparaison de nos données avec la base de données GO n'a pas donné de résultat significatif : les répartitions des compartiments cellulaires, des processus biologiques et des fonctions moléculaires sont donc aléatoires. Nous avons toutefois choisi de discuter les protéines HSP 27 et l'isoforme alpha de la calponine 1 en raison de leur surabondance dans ce groupe. Une régulation positive de la protéine HSP 27 a été trouvée dans les foies de rat modèle du diabète de type II ayant développé une stéatose hépatique (Kumar Sharma *et al.*, 2011). Cette régulation positive a été associée à une réduction du développement de la stéatose hépatique, après administration de naringine un flavonoïde du pamplemousse. La calponine est un des marqueurs exprimés par les cellules hépatiques stellaires différenciées (Atzori *et al.*, 2009). Les cellules hépatiques stellaires jouent un rôle primordial dans la production et l'accumulation de matrice extracellulaire dans les cas de fibrose. L'unique détection de ces deux protéines dans le groupe 'Fonte élevée' pourrait paraître contradictoire, mais nous pensons que c'est le signe de la mise en place de mécanismes de défense, ce qui serait cohérent avec les résultats obtenus dans la fraction soluble à faible force ionique et viendrait donc de nouveau renforcer notre hypothèse.

Dans le groupe 'Fonte faible', la comparaison de nos données avec la base de données GO a révélé une surabondance de protéines ribosomales. Les gènes codant pour les protéines ribosomales sont surexprimés au cours du gavage de l'oie (Zhu *et al.*, 2011). De plus, des facteurs de traduction ont été rapportés surexprimés au cours du gavage des canards (Bax *et al.*, 2011) et de l'oie (Zhu *et al.*, 2011). Ceci est cohérent avec l'augmentation de la teneur en protéines observée au début de l'accumulation des lipides dans le foie (Bénard et Labie,

1998 ; Gabarrou *et al.*, 1996). La surexpression de protéines ribosomales à 20 minutes *post mortem* dans le groupe 'Fonte faible' confirme l'hypothèse selon laquelle les foies de ce groupe sont, au moment de l'abattage, toujours dans un processus de synthèse des constituants, en particulier ici de protéines. Dans le cadre du second volet, nous avons pu valider ces résultats sur un échantillonnage différent grâce à l'immunodétection de la protéine MIMP par Western-Blot (Tableau 21). En ce sens, la protéine MIMP pourrait être un bon marqueur de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard.

En conclusion, si l'approche protéomique a porté sur deux fractions protéiques différentes, les résultats montrent une cohérence entre eux. Globalement, l'expression des protéines à 20 minutes *post mortem* révèle des différences dans l'état biologique des foies gras au moment de l'abattage des animaux. Il semble que les foies des animaux du groupe 'Fonte faible' soient dans des processus d'anabolisme, alors que les foies des animaux du groupe 'Fonte élevée' montrent des réactions de défense cellulaire, notamment contre le stress oxydatif. Ces derniers pourraient avoir atteint un état de stéatose plus avancé. Il est important de rappeler que les animaux, et donc les foies gras, constituant les deux groupes de comparaison ont connu le même parcours zootechnique et technologique. Aussi, **notre hypothèse est que les différences observées quant à l'aptitude à la transformation pourraient être la conséquence d'une cinétique de développement de la stéatose différente**, probablement liée à une variabilité de l'aptitude à l'engraissement hépatique, induisant une réponse au gavage plus ou moins intense, dans les groupes 'Fonte élevée' et 'Fonte faible' respectivement. Cette hypothèse est appuyée par les observations zootechniques réalisées dans différentes études qui ont montré un effet néfaste de l'allongement de la durée de gavage sur le rendement technologique en intensifiant la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard (Setiawan, 1994) et de l'oie (Bouillier-Oudot *et al.*, 2002). Au delà de deux semaines de gavage, Labie *et al.* (1989) ont d'ailleurs observé des ruptures des membranes cellulaires, et Babilé (1989) a démontré une augmentation de la teneur en LDH sérique après un gavage de 20 jours par rapport à un gavage de 14 jours, ce qui selon Auvergne (1992) serait le signe de lésions des membranes cellulaires et donc de l'accroissement de leur perméabilité.

Si notre hypothèse est vérifiée, cela voudrait dire que dans un lot de canards soumis au même rythme de gavage, certains animaux arrêtent le développement de la stéatose hépatique avant la fin du gavage, stabilisent le poids de foie et mettent en place des processus de défense cellulaire. D'autres animaux en revanche poursuivent les processus anaboliques. Ainsi, à

l'abattage, pour des poids de foie similaires, le premier groupe présenterait des qualités technologiques amoindries. Les mécanismes reliant le stade de développement de la stéatose hépatique et l'aptitude à la cuisson ne peuvent pas être clairement établis à ce stade, mais la discussion de la suite des résultats nous permettra de formuler de nouvelles hypothèses sur cette question.

#### *Expression des protéines au cours du refroidissement*

Dans la fraction soluble à faible force ionique, la comparaison des profils protéiques à 20 minutes et à 6 heures *post mortem* indique une diminution globale de l'expression des protéines, dans les groupes 'Fonte faible' (Tableau 17) ou 'Fonte élevée' (Tableau 18).

L'expression des protéines impliquées dans des processus d'oxydo-réduction montre globalement une diminution au cours du refroidissement. Ce résultat peut être rapproché des observations réalisées dans le muscle squelettique et qui montrent que l'évolution *post mortem* se traduit par une diminution du système de défense anti-oxydant chez le boeuf (Renerre *et al.*, 1996) et la dinde (Renerre *et al.*, 1999). Cependant, la diminution des processus d'oxydo-réduction est moins prononcée dans le groupe 'Fonte élevée' où l'on détecte à 6 heures *post mortem* la protéine aldéhyde déshydrogénase (spot 76) et où l'on note la surexpression de la protéine Prdx3 (spot 196). Ce résultat suggère une protection moindre de la réfrigération chez les individus du groupe 'Fonte élevée', ou bien une diminution insuffisante pour atténuer les différences observées à 20 minutes *post mortem*.

L'expression des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique montre globalement une augmentation dans le groupe 'Fonte faible' et une diminution dans le groupe 'Fonte élevée' au cours de la réfrigération. Ces résultats sont cohérents avec l'expression des protéines à 20 minutes *post mortem*, dans le sens où les processus métaboliques seraient plus intenses dans le groupe 'Fonte élevée' à 20 minutes *post mortem*, et des activités résiduelles pourraient se poursuivre après la mort de l'animal, de la même façon que dans le muscle squelettique (Lawrie, 1998).

L'expression des protéines impliquées dans des activités protéolytiques montre une diminution au cours de la réfrigération, quel que soit le niveau de fonte à la cuisson. Dans le groupe 'Fonte faible', trois spots sont sous exprimés à 6 heures : la prépro cathepsine D (spots

188 et 234) et le précurseur de la cathepsine D (spot 222), et un seulement dans le groupe 'Fonte élevée' : le précurseur de la cathepsine D (spot 222). Dans tous les cas, il s'agit de formes inactives ou de précurseurs de la protéase. Ce résultat pourrait indiquer une activité protéolytique plus faible dans le groupe 'Fonte faible', ou au contraire une activation de la protéine au cours de la réfrigération. Les cathepsines sont impliquées dans la protéolyse *post mortem* dans la viande et les produits carnés (Roncalés *et al.*, 1995 ; Molly *et al.*, 1997), il est donc envisageable qu'elles soient aussi actives dans le foie gras et qu'elles interviennent dans son évolution *post mortem*.

L'observation des protéines chaperones indique une diminution après refroidissement, quel que soit le niveau de fonte. De la même façon que pour les protéines impliquées dans les processus d'oxydo-réduction, il semble que la réfrigération ait un effet inhibiteur de l'expression des chaperones, équivalent dans les deux groupes de fonte.

Dans la fraction protéique non soluble à faible force ionique, les résultats ont montré que 32 groupes de protéines étaient en augmentation et 35 en diminution au cours du refroidissement dans le groupe 'Fonte faible', et 45 en augmentation et 13 en diminution dans le groupe 'Fonte élevée'. La discussion sera menée sur les protéines communes aux deux groupes de fonte de façon à déterminer un ratio entre les deux temps *post mortem*, et ainsi semi-quantifier l'évolution des groupes au cours de la réfrigération.

Dans le groupe 'Fonte faible', l'analyse des données avec la base de données GO n'a révélé aucun résultat significatif en terme de surreprésentation d'un compartiment cellulaire, d'un processus biologique ou d'une fonction moléculaire.

De la même façon, dans le groupe 'Fonte élevée', les protéines en diminution au cours du refroidissement semblent présenter une répartition aléatoire. En revanche, les 45 groupes en augmentation indiquent une forte représentativité des protéines du cytosquelette. Dans le second volet, l'expression de la beta-énolase a été étudiée par Dot-Blot (Figure 21), et les résultats confirment une augmentation au cours du temps, identique dans les deux groupes de fonte. Au cours de la conservation *post mortem* de foie de porc à 37°C, la synthèse de protéines diminue progressivement et cesse environ quatre heures *post mortem* (Rauch and Kas, 1983). Dans notre cas, les foies ont été réfrigérés à 4°C, ce qui pourrait d'autant plus inhiber l'anabolisme des protéines. Aussi, nous pensons que la forte représentativité de protéines du cytosquelette à 6 heures *post mortem* dans le groupe 'Fonte élevée' est le résultat

de l'hydrolyse de ces protéines avec l'apparition de fragments responsables de la surexpression observée de ce type de protéines. L'hydrolyse des protéines du cytosquelette est impliquée dans le déterminisme de la capacité de rétention d'eau de la viande de porc (Kristensen et Purslow, 2001), elle peut avoir lieu dès 45 minutes jusqu'à 6 heures *post mortem* (Melody *et al.*, 2004). Ces résultats impliqueraient la protéolyse dans les mécanismes de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras et confirmeraient ainsi ceux obtenus dans la fraction protéique soluble à faible force ionique.

En conclusion, cette étude est la première s'intéressant à l'évolution du protéome du foie gras *post mortem*. Il est difficile d'étayer nos hypothèses avec la littérature, si ce n'est avec ce qui a pu être mis en évidence dans la viande et les produits carnés, tout en restant vigilants sur les nombreuses différences entre les deux tissus. L'expression globale de la fraction non soluble à faible force ionique montre une diminution après refroidissement. Ce résultat est cohérent avec des observations pratiques qui suggèrent qu'une réfrigération plus rapide des foies gras (par la mise en place de l'éviscération à chaud en comparaison de l'éviscération à froid) a un effet positif sur le rendement technologique (Bouillier-Oudot *et al.*, 2002). Dans ce cas, la réduction de la fonte lipidique à la cuisson pourrait s'expliquer par une stabilisation plus rapide du tissu et notamment une inhibition des réactions protéolytiques dans le tissu. A l'inverse, la réfrigération ne semble pas suffisante pour enrayer des mécanismes sans doute déjà enclenchés précocément dans les foies gras du groupe 'Fonte élevée'. La conséquence d'une moindre efficacité du refroidissement sur les foies gras du groupe 'Fonte élevée' serait une protéolyse plus intense, se traduisant par la lyse du cytosquelette. Le tissu fragilisé serait plus sensible aux contraintes mécaniques de la cuisson conduisant à une augmentation de la fonte à la cuisson.

Une fragilisation du tissu avant ou au cours de la cuisson peut avoir des conséquences à l'échelle de la structure non lipidique ou à l'échelle des gouttelettes. De sorte à caractériser le foie gras de canard de l'abattage au produit fini, après cuisson, nous avons employé différentes méthodes histologiques.



## **Observations histologiques du foie gras cru et cuit en relation avec la fonte lipidique à la cuisson**

Les objectifs de cette partie étaient de (i) caractériser la structure du tissu hépatique de l'abattage au produit fini, à l'échelle du tissu et des gouttelettes lipidiques, (ii) de mettre en évidence l'évolution de la structure au cours de la réfrigération (dans le volet 1) et de la cuisson et enfin (iii) d'établir le lien entre la fonte lipidique à la cuisson et les caractéristiques structurales. Pour répondre à ces objectifs, nous avons employé des méthodes complémentaires permettant des observations du tissu de l'échelle structurale à l'échelle moléculaire. Une première étape d'adaptation des méthodes au foie gras a été nécessaire.

Jusqu'à aujourd'hui, les méthodes histologiques employées pour la caractérisation du foie gras reposaient sur une fixation au formaldéhyde suivie d'étapes de déshydratation dans des solvants organiques, puis une inclusion en paraffine (Blum et Leclercq, 1973 ; Bénard et Labie, 1998 ; Bouillier-Oudot *et al.*, 2006 ; Locsmándi *et al.*, 2007). Avec ce type de méthode, il n'est pas possible d'observer les lipides au sein du tissu. En effet, les lipides ne sont pas fixés et sont élués lors des étapes de déshydratation (Fujimoto *et al.*, 2008). Dans un premier temps, nous avons donc stabilisé le tissu par cryo-fixation, ce qui permet de conserver les lipides ainsi que les sites antigéniques. En parallèle, nous avons procédé à une double fixation chimique au glutaraldéhyde puis au tétroxyde d'osmium, suivie d'inclusions en résine Epoxy. Le tétroxyde d'osmium réagit avec les lipides et les rend insolubles (Riesmersma, 1968), stabilisant ainsi les structures et permettant la préservation du tissu en vue de la confection des coupes semi et ultra fines. Le contenu et la forme des gouttelettes lipidiques ne sont pas modifiés après une déshydratation à l'éthanol lorsque le tissu est fixé de cette façon (Fukumoto et Fujimoto, 2002).

La caractérisation du foie gras à l'échelle structurale par la combinaison d'immuno-marquage et de colorations histologiques a fait l'objet d'adaptation au cours de ce projet. L'objectif était de mettre en évidence le contour des cellules par l'immuno-marquage du collagène et la coloration des structures non lipidiques, puis de détecter les lipides après coloration. Dans le premier volet, la combinaison des méthodes n'était pas optimale ; il est apparu, après analyse d'images, une forte co-localisation des différents signaux au niveau des structures non lipidiques masquant l'information relative aux lipides de réserve. L'automatisation des acquisitions, bien que le temps de pose fût fixé, a certainement contribué

au photoblanchiment nous empêchant de mettre en évidence de façon nette les lipides. C'est la raison pour laquelle la méthode a évolué entre les deux volets.

La caractérisation de la structure du foie gras avant et après cuisson en lien avec la fonte lipidique à la cuisson est basée sur l'hypothèse d'une variation d'évolution de la matrice non lipidique favorisant l'expulsion des lipides sous l'effet du traitement thermique. Au cours de la cuisson, nous avons bien mis en évidence une augmentation du taux de matrice non lipidique, correspondant probablement à la coagulation des protéines de la matrice extracellulaire, conformément à ce qui est observé dans la viande (Tornberg, 2005, Astruc *et al.*, 2010). Dans les deux volets, nous avons observé une augmentation du taux de matrice après cuisson. Dans le volet 1, ce résultat n'était pas lié à la fonte lipidique à la cuisson. En revanche, dans le second volet, nous avons évalué la densification par le rapport de la matrice colorée après cuisson sur celle colorée avant cuisson. Cet indice est supérieur dans le groupe 'Fonte élevée' suggérant une densification de la matrice non lipidique au cours de la cuisson plus importante. Or, l'analyse des spectres FTIR n'a pas démontré de lien entre le niveau de dénaturation des protéines et la fonte lipidique. Une évolution variable de la dénaturation des protéines de la matrice ne semble donc pas être la raison de la différence de fonte à la cuisson. En revanche, une fragilisation de la matrice protéique induite par un niveau de protéolyse plus important, comme le suggèrent les résultats de l'analyse protéomique, pourrait expliquer une sensibilité plus grande au traitement thermique des foies gras du groupe 'Fonte élevée'.

Enfin, l'ensemble des résultats permet de valider la pertinence de la méthode employée puisque le marquage des lipides au Rouge de Nile après cuisson est moindre dans les foies gras cuits qui présentent un niveau de fonte élevé.

L'étude de la morphologie des gouttelettes avant cuisson révélait des formes circulaires, non délimitées par une membrane (dans le sens d'une bicouche phospholipidique) (Figure 29) conformément aux observations de Fujimoto *et al.* (2008) sur des gouttelettes isolées de cellules hépatiques HepG2. Nos observations indiquent que le grand nombre de gouttelettes au sein des hépatocytes semble exercer une sorte de 'pression' qui repousse les organites, dont le noyau, à la périphérie ; ceci a également été observé par Blum et Leclercq (1973).

Après cuisson, la surface des gouttelettes lipidiques est plus importante et elles ont perdu leur forme sphérique. Boström *et al.* (2005) ont observé, par microscopie confocale, des gouttelettes lipidiques de fibroblastes après leur fusion et ont constaté que le volume total

n'était pas modifié, cela peut alors causer une diminution du ratio surface / volume et donc un excès de phospholipides (Ohsaki *et al.*, 2009). Les filaments que nous observons au sein des gouttelettes pourraient alors être des phospholipides, mais aussi des protéines dénaturées incorporées au cœur des gouttelettes après fusion (Ohsaki *et al.*, 2009). De plus, du matériel non lipidique coagulé peut être observé à la périphérie ou à l'intérieur des gouttelettes. Cela correspond à ce qui peut être trouvé dans la viande où la cuisson conduit à la dénaturation et l'aggrégation de protéines (Tornberg, 2005, Astruc *et al.*, 2010).

L'apparition d'une classe d'aire de gouttelettes lipidiques de grandes tailles spécifiques de l'état cuit, la diminution du nombre de gouttelettes de petite taille ainsi que la relation entre la taille et la forme des gouttelettes suggèrent la présence de fusions au cours de la cuisson. En effet, la fusion de petites gouttelettes résulterait en la formation de plus grandes gouttelettes de forme complexe. Les observations en microscopie électronique nous permettent d'impliquer la 'pression' exercée par les gouttelettes les unes sur les autres pour expliquer ce phénomène de fusion. Ce mécanisme de 'pression' lié à la densité des gouttelettes lipidiques est bien documenté dans d'autres types cellulaires, tels que les préadipocytes (Mc Donough *et al.*, 2009) ou encore dans des cultures cellulaires d'adipocytes (Gazi *et al.*, 2007), où des grappes de plusieurs dizaines à centaines de gouttelettes sont agglomérées. Dans ces grappes, une force mécanique s'exerce et presse les gouttelettes les unes contre les autres, ce qui conduit à la perte de sphéricité de ces dernières (Thiele et Spandl, 2008).

Avant cuisson, la distribution du nombre et de l'indice de forme des gouttelettes lipidiques est différente entre les deux niveaux de fonte : il y en a plus dans les foies du groupe 'Fonte faible', ceci est d'autant plus vrai pour les plus petites, et leur forme est plus circulaire. Cette différence suggère que des fusions ont lieu dans le foie gras cru, et avec plus d'intensité dans le groupe 'Fonte élevée'. Ces résultats sont cohérents avec des observations réalisées sur foie gras d'oie. En effet, dans une étude portant sur l'influence du rythme alimentaire et du sexe de l'animal sur le rendement technologique du foie gras d'oie, une augmentation de la fonte a été reliée à une augmentation de la taille des gouttelettes (Bouillier-Oudot *et al.*, 2008).

Après cuisson, la distribution du nombre et de l'indice de forme des gouttelettes est similaire entre les deux niveaux de fonte. Cela suggère que le traitement thermique cause des changements importants dans la morphologie des gouttelettes, de façon tellement drastique que cela atténue les différences de morphologie des gouttelettes entre les niveaux de fonte.

Néanmoins, la classe spécifique de l'état cuit comporte plus de gouttelettes dans le groupe 'Fonte élevée' que dans le groupe 'Fonte faible'. Cela pourrait être le reflet de fusions plus importantes au cours de la cuisson en relation avec un niveau de fonte lipidique à la cuisson élevé.

Les mécanismes à l'origine de la fusion de gouttelettes lipidiques dans le foie gras avant cuisson restent incertains. L'implication des microtubules a été démontrée par la formation de complexes entre les gouttelettes de fibroblastes (Boström *et al.*, 2005). Dans les mêmes conditions, le rôle de protéines de surface dans la médiation des fusions a été évoquée (Boström *et al.*, 2007). De plus, une incorporation de lipides directement via une continuité entre le réticulum endoplasmique et les gouttelettes peut être la cause de l'accroissement de la taille des gouttelettes, mais cela est difficile à mettre en relation avec la diminution du nombre de celles-ci. Enfin, une différence en composition élémentaire des lipides constitutifs des gouttelettes pourrait être envisagée comme favorisant les fusions. La densification de la matrice non lipidique évoquée précédemment est certainement à l'origine des fusions observées au cours de la cuisson.

Nous avons pu observer avant cuisson une hétérogénéité de coloration, suggérant une différence de composition des lipides. En effet, le tétraoxyde d'osmium se fixe sur les double liaisons des acides gras, ce qui confère une densité aux électrons observable en microscopie optique (Hayes *et al.*, 1963, Adams *et al.*, 1967). Cheng *et al.* (2009) ont étudié la densité aux électrons des lipides en relation avec leur degré d'insaturation, et ont montré que cette densité est supérieure dans des fibroblastes traités avec de l'acide docosahexanoïque (C22 :6), suivis par ceux traités à l'acide linoléique (C18 :2) puis par l'acide oléique (C18 :1). Nos résultats montrent un niveau de gris supérieur dans le groupe 'Fonte faible', et donc une intensité de coloration moins importante, suggérant un degré d'insaturation inférieur dans les lipides de ces gouttelettes. Ce résultat n'a pu être validé par l'approche biochimique du profil en triglycérides. La différence de dimension des méthodes est certainement à l'origine de ce résultat. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à caractériser la composition élémentaire des gouttelettes lipidiques du foie gras par FTIR.

La résolution spatiale offerte par le rayonnement synchrotron IR ainsi que la large gamme spectrale (Miller et Dumas, 2006, Dumas *et al.*, 2007) nous auraient permis de caractériser les gouttelettes lipidiques en acquérant des spectres dans les zones présentant des intensités de coloration plus ou moins importantes. Pour cela, nous avons demandé du temps de faisceau sur la ligne UV DISCO, de sorte à délimiter les cellules par la détection du

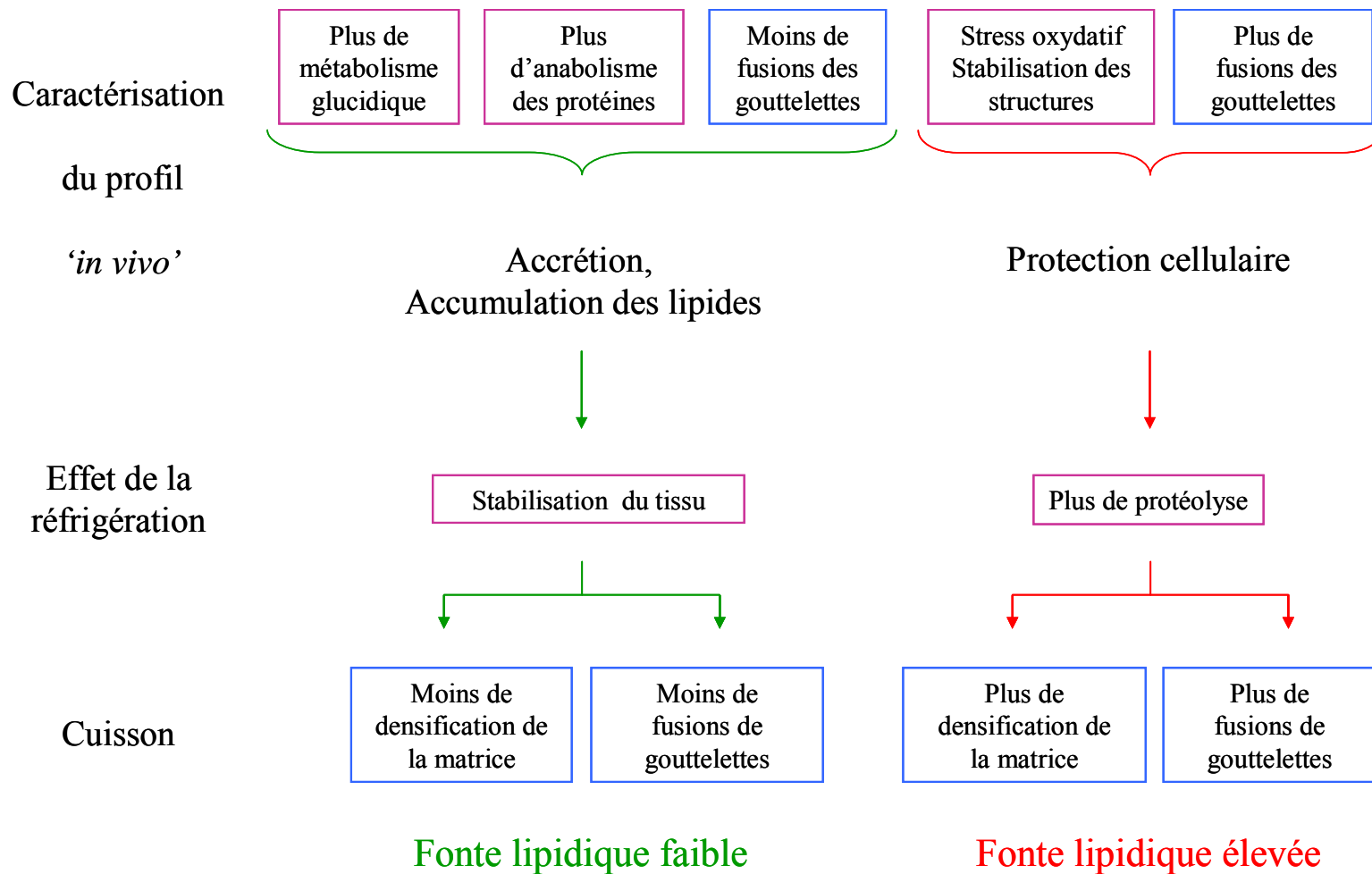
collagène, et sur la ligne IR SMIS pour compléter les observations par la caractérisation des lipides notamment. Nous avons eu du temps de faisceau disponible pour la ligne DISCO seulement, et nous avons pu acquérir des données en microscopie FTIR avec une source interne (moindre résolution spatiale qu'avec le rayonnement synchrotron).

Cette approche nous a permis de caractériser le foie gras de canard en FTIR, et ainsi d'acquérir de nombreuses données pionnières dans le domaine. Le profil global des spectres FTIR est similaire à celui de stéatose humaine non alcoolique (Le Naour *et al.*, 2009) obtenus sur des prélèvements hépatiques non tumoraux. De plus, les spectres en dérivée seconde de la bande des amides I montre un effet important de la cuisson. La dénaturation thermique est mise en évidence par une diminution du pic à  $1654\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux hélices  $\alpha$ , et à une augmentation du pic à  $1624\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux feuillettes  $\beta$  (Barth, 2007). Ce résultat est conforme à ceux observés par d'autres auteurs sur des coupes de tissu musculaire (Kirschner *et al.*, 2004). En revanche, peu de différence d'évolution de cette structure secondaire est observé selon taux de fonte, suggérant que ce dernier n'est pas lié à une variation du niveau de dénaturation protéique à la cuisson.

Le spectre UV du foie gras de canard présente un pic important correspondant à l'autofluorescence du tryptophane, et la bande correspondant au collagène ne montre pas de pic bien défini comme cela peut être observé en UV en rayonnement synchrotron également dans le cas de pathologie comme la cirrhose chez l'humain (Petit *et al.*, 2010).

La première approche d'analyse des résultats n'a pas permis de relier la fonte lipidique à la cuisson avec les caractéristiques spectrales. Mais nous pensons que la perte de l'information spatiale en travaillant 1) avec une source interne infrarouge et 2) sur des spectres moyens pourrait être la cause de ce résultat. Aussi une analyse plus poussée de ces données fait partie des perspectives à court terme.

En conclusion, l'approche combinée de différentes méthodes d'observation du tissu a permis de relier la fonte lipidique à la cuisson avec la densification de la matrice non lipidique au cours de la cuisson et les phénomènes de fusion des gouttelettes lipidiques. Ces résultats ont été obtenus à taux d'engraissement équivalent. Ils font donc émerger des mécanismes indépendants de la teneur en lipides, impliqués dans la variabilité de la fonte dans une gamme de poids et de taux de lipides restreinte. Les mécanismes à l'origine des fusions avant cuisson restent à déterminer, mais ce travail a permis de collecter un grand nombre de données dont l'analyse peut se poursuivre au-delà du travail de thèse, ce qui devrait apporter de nouvelles réponses.



**Figure 41 :** Synthèse des résultats – Proposition de mécanismes à l’origine de la variabilité de la fonte lipidique du foie gras de canard. Le schéma est construit autour des résultats acquis en protéomique (cadre violet) et en histologie (cadre bleu).

## **Synthèse des résultats – Vers une proposition de mécanismes à l’origine de la variabilité de la fonte lipidique du foie gras de canard (Figure 41)**

Au moment de l’abattage des animaux, à 20 minutes *post mortem*, nous avons vu que les animaux du groupe ‘Fonte faible’ se différencient de ceux du groupe ‘Fonte élevée’ par un anabolisme des protéines plus important, ainsi que des réserves énergétiques en glucides supérieures. A partir de ces résultats, nous avons suggéré que les foies gras de ce groupe étaient toujours dans un processus d’accrétion, et d’adaptation à la lipogenèse *de novo* très intense. Les animaux du groupe ‘Fonte élevée’ présentent une surexpression de protéines impliquées dans des mécanismes de défense cellulaire, notamment autour du stress oxydatif. Ceci est confirmé par l’approche métabolomique, conduite en parallèle du travail de thèse, qui a identifié une teneur supérieure de la bétaine dans le groupe ‘Fonte élevée’ (Guerra, 2011). La bétaine est impliquée dans des mécanismes de protection cellulaire dans le cas de stéatose non alcoolique (Neuschwander-Tetri, 2001). De plus, à partir de l’intensité en coloration supérieure dans les gouttelettes lipidiques des foies au niveau de fonte élevée, nous avons émis l’hypothèse d’un degré d’insaturation plus important, bien que l’approche biochimique ne nous ait pas permis de confirmer ce résultat. La plus grande sensibilité des acides gras insaturés à l’oxydation pourrait étayer cette hypothèse. Au niveau histologique, l’implication des fusions des gouttelettes lipidiques dans le foie gras cru est indépendante du taux d’engraissement. Sa prépondérance dans le groupe ‘Fonte élevée’ relève bien des mécanismes qui en sont la cause. A ce jour, nous n’avons pu les identifier mais les perspectives à court terme sont de travailler sur la validation de cette hypothèse qui nous semble importante dans la mise en place de la variabilité de la fonte lipidique.

En considérant la mise en place de la stéatose hépatique des palmipèdes comme un processus dynamique, il ressort de ces résultats que les animaux du groupe ‘Fonte élevée’ ont atteint un stade physiologique plus avancé, auquel ils répondent par des processus altérant la qualité technologique finale du produit. Le lien entre la capacité de stéatose des animaux et l’aptitude à la transformation des produits mérite en ce sens de faire l’objet d’études approfondies.

Au cours de la réfrigération, l’analyse protéomique a démontré une plus forte diminution de l’expression des protéines dans le groupe ‘Fonte faible’, suggérant une stabilisation du tissu par le froid supérieure, notamment en termes d’activités enzymatiques.

Ainsi, nous avons également identifié une forte représentativité de protéines du cytosquelette en augmentation dans le groupe 'Fonte élevée', et avons considéré que cela correspondait à des fragments issus de la protéolyse. En métabolomique, une variation de quantité relative de glutamate et d'alanine suggère un potentiel protéolytique plus important des foies du groupe 'Fonte élevée', dès l'abattage et au cours de la réfrigération. En effet, le rapport des deux composés a été identifié dans le muscle *post mortem*, en liaison avec l'activité protéolytique (Lopez-Bote *et al.*, 2008). La dégradation de la matrice protéique pourrait favoriser la fusion des gouttelettes et expliquer la prépondérance de ce phénomène dans le groupe 'Fonte élevée' à la fois à 20 minutes *post mortem* et au cours de la cuisson. Le résultat serait un tissu plus fragilisé et donc plus propice à la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard.



*CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES*

Ce travail de thèse, qui reposait sur une approche multidisciplinaire, avait pour objectif premier d'identifier des mécanismes impliqués dans le déterminisme biologique de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard. Pour répondre à cet objectif, nous avons concentré nos travaux sur la caractérisation biochimique du foie gras, l'expression des protéines à l'abattage et son évolution *post mortem* et enfin l'étude du tissu par microscopies. L'application de ces différentes méthodes avait pour origine une ou plusieurs hypothèses que ce travail a permis de confirmer ou d'infirmer. Ce projet a également permis d'ouvrir de nouvelles pistes de réflexion.

Dans un premier temps il a été nécessaire d'adapter les méthodes, notamment de protéomique et d'histologie, à l'étude du foie gras principalement en raison de la forte teneur en lipides. En protéomique, la méthodologie reposait sur l'élimination des lipides susceptibles d'empêcher une séparation correcte des protéines. La définition des spots d'intérêt sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle ainsi que le nombre important de protéines identifiées grâce à la stratégie 'Shot-Gun' confirment avec succès l'adéquation des méthodes et valident la pertinence des résultats obtenus. A l'inverse, en histologie, l'idée première était de conserver les lipides au sein du tissu afin d'observer les caractéristiques morphologiques des gouttelettes lipidiques ainsi que la répartition des lipides de réserve dans leur ensemble. La mise en évidence des lipides à la fois en fluorescence par la coloration Rouge de Nile et en fond clair par la fixation du tétr oxyde d'osmium confirme l'intérêt des méthodes de fixation utilisées.

Comme évoqué précédemment, plusieurs hypothèses ont été formulées quant à l'implication de certains mécanismes dans l'expression de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard. Ces hypothèses sont issues des connaissances déjà acquises dans le domaine, ou de l'analogie faite avec le phénomène de perte en eau à la cuisson de la viande.

Ainsi, l'approche biochimique a été abordée dans de nombreuses études sur la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard et portaient principalement sur les lipides de réserve et membranaires, et les acides gras totaux. Le rôle de la fragilité membranaire des hépatocytes ou encore celui du point de fusion des acides gras dans le déterminisme de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard n'a pas pu être vérifiées. Dans ce travail, il s'agissait de vérifier si la composition en triglycérides, forme largement majoritaire de lipides de réserve, permettait d'obtenir des informations relatives à la fonte lipidique grâce au point

de fusion des acides gras les constituant. De plus, nous avons mesuré le statut oxydant des protéines et des lipides de sorte à valider le rôle du stress oxydatif identifié en protéomique. Enfin, nous avons évalué la teneur en trame conjonctive susceptible d'influencer le comportement du tissu au cours de la cuisson, tout comme dans le cas dans la viande. Globalement, l'approche biochimique n'a pas mis en évidence de lien entre les caractéristiques biochimiques et la fonte lipidique à la cuisson. Il est probable que la teneur globale du tissu en constituants biochimiques ne constitue pas une approche suffisamment fine pour identifier des mécanismes à l'origine de la fonte à la cuisson. Une localisation privilégiée des composés dans le tissu est certainement une approche plus pertinente pour une meilleure compréhension du phénomène de fonte.

Dans ce sens, l'étude histologique du foie gras cru et cuit nous a donné des premiers éléments de réponse. En effet, nous avons mis en relation la fonte lipidique à la cuisson du foie gras avec un degré supérieur de la densification de la matrice non lipidique. Ce résultat est le premier dans le domaine qui permet de confirmer l'hypothèse soulevée régulièrement quant à une capacité du tissu à conserver ou rejeter les lipides lors de la cuisson. De plus, nous avons confirmé la relation entre la morphologie des gouttelettes lipidiques et la fonte lipidique à la cuisson. L'originalité de nos travaux repose sur le fait que les résultats ont été acquis à taux d'engraissement équivalent, sur les gouttelettes individuellement et ont permis d'impliquer les phénomènes de fusions de ces gouttelettes avant et au cours de la cuisson du foie gras. Les hypothèses relatives à l'origine des fusions restent à valider par la combinaison de la localisation et de la composition chimique et moléculaire susceptible de favoriser le phénomène. A court terme, le travail d'analyse des données obtenues en microspectroscopies FTIR et UV devrait nous permettre d'obtenir des premiers éléments de réponse.

Enfin, l'étude de l'expression des protéines du foie gras à l'abattage et après refroidissement a fait ressortir des différences de profil selon le niveau de fonte à la cuisson. Il apparaît une différence de stade physiologique des animaux au moment de l'abattage : dans un cas les profils protéiques révèlent un métabolisme énergétique et un anabolisme, notamment des protéines, intense au moment de l'abattage ; alors que dans l'autre cas les profils protéiques indiquent l'expression de protéines de réponse à un stress cellulaire notamment oxydatif. Nous pensons que les différences observées au moment de l'abattage pourraient provenir d'une aptitude à la stéatose hépatique plus ou moins importante des animaux, en réponse au gavage. Ainsi, pour des animaux élevés dans les mêmes conditions, certains atteindraient leur capacité maximale de stockage de lipides dans le foie plus tôt, s'orientant alors vers des mécanismes de protection cellulaire, alors que d'autres

poursuivraient les processus d'accumulation et de synthèse des constituants. Le lien entre l'aptitude à stéatose hépatique et l'aptitude à la transformation des foies gras devra être confirmé par des analyses portant sur les mécanismes de stéatose tels que les capacités de synthèse et d'exportation des lipides. De plus, l'évolution de l'expression des protéines au cours du refroidissement indique une différence entre les niveaux de fonte. Tout d'abord, dans le cas d'une fonte à la cuisson faible, la diminution globale de l'expression des protéines semble plus marquée, et dans le cas d'une fonte élevée, les activités protéolytiques semblent plus intenses. Les résultats acquis dans le cadre de ce travail ne permettent pas de statuer clairement sur le rôle de la protéolyse dans la fonte lipidique à la cuisson. Toutefois, un projet de recherche est d'ores et déjà engagé dans le laboratoire grâce à la thèse de Sahar Awde qui porte sur le profil protéolytique du foie gras et son évolution *post mortem*, en relation avec la fonte lipidique à la cuisson.

Le second objectif de la thèse était de définir des marqueurs de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard. Le second volet du projet devait permettre de valider les marqueurs définis dans le cadre du premier volet. Ainsi, certaines protéines dont l'expression était reliée à la fonte ont été analysées par Western et Dot-Blot. A ce jour, seule la protéine MIMP constituerait un marqueur potentiel de la fonte lipidique à la cuisson. Néanmoins, un grand nombre de protéines testées ont été écartées des analyses en raison de l'absence de réaction immunologique chez le canard. Aussi, il est à envisager de compléter ces résultats en testant de nouveaux anticorps. De plus, dans le cadre plus large du projet, il est prévu de tester ces mêmes marqueurs sur des échantillons prélevés en industrie. Cela devrait permettre de confirmer l'implication des phénomènes identifiés dans des lots d'élevage, de gavage et d'abattage différents. En histologie, nous avons opté pour une stratégie différente. La validation des marqueurs potentiels que sont les fusions des gouttelettes lipidiques a été abordée sous un autre angle, à savoir l'étude des phénomènes à l'origine de ces fusions. C'est la raison pour laquelle nous avons fait appel à des méthodes permettant de combiner la composition et la localisation des composés d'intérêt, protéines et lipides principalement. Enfin, l'évolution des méthodes de coloration appliquées aux coupes à congélation a permis avec succès de définir le degré de densification comme un marqueur potentiel de la fonte. Ce résultat encourageant devrait faire l'objet d'études plus approfondies avant d'envisager de le valider en analysant un grand nombre d'échantillons. En effet, ce sont des méthodes longues à mettre en œuvre et il nous semble plus pertinent de travailler sur l'origine du mécanisme dans un premier temps. Pour cela, il serait pertinent d'employer la technique d'analyse enthalpique

différentielle qui consiste à soumettre un échantillon à un cycle thermique contrôlé et à comparer en continu le flux de chaleur différentiel nécessaire pour maintenir le tissu et une référence inerte à la même température. Appliqué à l'étude de la viande, cette technique a permis de quantifier le niveau de dénaturation des protéines et donc indirectement l'intensité du traitement thermique subi par l'échantillon (Stabursvik et Martens, 1980 ; Tornberg, 2005 ; Picgirard, 2010). L'application de cette méthode devrait permettre de statuer sur une réponse différente de la matrice protéique à la cuisson influençant le niveau de fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard.

La principale hypothèse qui émerge de ce travail repose sur une possible relation entre le niveau de fonte lipidique à la cuisson et le stade physiologique de développement de la stéatose. Pour vérifier cette hypothèse, il serait pertinent d'étudier, grâce à des méthodes non invasives, la cinétique de croissance pondérale du foie au cours du gavage afin de définir le stade auquel le foie se rapproche le plus du poids qui sera observé à l'abattage. Il serait alors possible de mettre en relation l'expression des marqueurs de la fonte élevée avec le temps depuis lequel le foie a considérablement réduit sa croissance pondérale.

*REFERENCES*

*BIBLIOGRAPHIQUES*

**A.O.A.C.** 1989. A.O.A.C. Official method 990.03. Protein (crude) in animal feed combustion method (Dumas method). *JAOAC*. 72 : 770.

**Adams, C. W., Abdulla, Y. H., Bayliss, O. B.** 1967. Osmium tetroxide as a histochemical and histological reagent. *Histochemie*. 9 : 68-77.

**André, J. M., Guy, G., Gontier-Lattonnelle, K., Bernadet, M. D., Davail, B., Hoo-Paris, R., Davail, S.** 2007. Influence of lipoprotein lipase activity on plasma triacylglycerol concentration and lipid storage in three genotypes of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 148A : 899-902.

**Apel, K., Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55 : 373-399.

**Astruc, T., Gatellier, P., Labas, R., Santé-Lhoutellier, V., Marinova, P.** 2010. Microstructural changes in *m. rectus abdominis* muscle after heating. *Meat Science*. 85 : 743-751.

**Atzori, L., Poli, G., Perra, A.** 2009. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 41 : 1639-1642.

**Auvergne, A.** 1992. Facteurs de variation de la composition corporelle et tissulaire des canards avant et après gavage. Thèse Docteur Etat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 252p.

**Auvergne, A., Babilé, R., Remond, D., Latil, G.** 1993. Digestibilité du maïs en gavage. Eléments de prédiction du gain de poids. In: *1<sup>ères</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Bordeaux, France. 75-89.

**Babilé, R., Auvergne, A.** 1986. Qualité des foies gras : Comparaison de différentes méthodes d'appréciation de la fonte lipidique; Evolution en fonction du temps. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. 162 : 151-156.

**Babilé, R., Auvergne, A., Delpech, P., Meirieu, O.** 1987. Evolution de la consommation de maïs au cours du gavage, incidence sur la production de foie gras de canard de Barbarie. *Annales de Zootechnie*. 36 : 73-74.

**Babilé, R.** 1989. La production de foies gras de canards de Barbarie (*Cairina moschata* : Aspects génétiques, nutritionnels et technologiques. Thèse Docteur Etat Institut National Polytechnique de Toulouse, 315p.

**Babilé, R., Auvergne, A., Setiawan, I., Joly, E., Latil, G.** 1993. Conduite alimentaire au cours du gavage des canards et qualité technologique du foie gras. In: *1<sup>ères</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Bordeaux, France. 107-116.

**Babilé, R., Auvergne, A., Borgida, L. P., Chambart, G.** 1994. L'apport protéique et minéral au cours du gavage est bénéfique. *L'aviculteur*. 81-82.

**Babilé, R., Auvergne, A., Andrade, V., Héraud, F., Bénard, G., Bouillier-Oudot, M., Manse, H.** 1996. Réversibilité de la stéatose hépatique chez le canard mulard. In: *2<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Bordeaux, France. 107-110.

**Babilé, R., Auvergne, A., Dubois, J. P., Bénard, G., Manse, H.** 1998. Réversibilité de la stéatose hépatique chez l'oie. In: *3<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Bordeaux, France. 45-48.

**Baéza, E., Rideau, N., Chartrin, P., Davail, S., Hoo-Paris, R., Mourot, J., Guy, G., Bernadet, M. D., Juin, H., Meteau, K., Hermier, D.** 2005. Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides : aptitudes à l'engraissement. *INRA Productions Animales*. 18 : 131-141.

**Bancroft, J. D., Stevens, A.** 1990. Theory and practice of histological techniques, 3<sup>rd</sup> editions. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp : 740.



- Barraud, C., Salladarre, P.** 1980. La qualité du foie gras. *R.T.V.A.* n°160 : 47-53.
- Barth, A.** 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochemica and Biophysica Acta.* 1767 : 1073-1101.
- Baudonnet, C.** 1993. Facteurs de variation de la composition biochimique et de la qualité technologique des foies gras de canards. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 182p.
- Baudonnet-Lenfant, C., Auvergne, A., Babilé, R.** 1991. Influence de la durée de jeûne avant l'abattage et de poids de la mise en gavage des canards de Barbarie sur la composition chimique hépatique. *Annales de Zootechnie.* 40 : 161-170.
- Bax, M. L., Chambon, C., Marty-Gasset, N., Rémignon, H., Fernandez, X., Molette, C.** 2011. Proteomic profile evolution during steatosis development in duck. Soumis dans *Poultry Science.*
- Bénard, G., Labie, C.** 1998. Evolution histologique du foie des palmipèdes au cours du gavage. In: *3<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras.* Bordeaux, France. 31-35.
- Bénard, G., Bénard, P., Prehn, D., Bengone, T., Jouglar, J. Y., Durand, S.** 1998. Démonstration de la réversibilité de la stéatose hépatique obtenue par gavage de canards mulards. Etude réalisée sur trois cycles de gavage-dégavage. In: *3<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras.* Bordeaux, France. 49-52.
- Bensadoun, A.** 1991. Lipoprotein lipase. *Annual Review of Nutrition.* 11 : 217-237.
- Bensadoun, A., Rothfield, A.** 1972. The form of absorption of lipids in the chicken, *Gallus domesticus.* *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 41 : 814-817.
- Bergmeyer, H. U.** 1974. In *Methods of enzymatic analysis* (ed. GH Bourne), pp. 1127, 1196, 1238, 1464. Academic Press, New York.

**Besnard, P., Niot, I., Poirier, H., Bernard, A., Caseeli, C.** 1997. Aspects cellulaires et moléculaires de l'absorption intestinale des acides gras. *Oléagineux, Corps gras et Lipides*. 4 : 185-191.

**Blum, J. C., Monachon, G., Leclercq, B.** 1971. Liver steatosis of force-fed geese as influenced by the protein level of the diet. *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*. 21 : 307-311.

**Blum, J.C., Leclercq, B.** 1973. Nouvelles précisions sur les modifications biochimiques et histologiques du foie provoquées par le gavage. *Journées Avicoles*. Varèse, Italia. 2 : 193-207.

**Blum, J. C., Labie, C., Raynaud, P.** 1990. Influence du poids et de la composition chimique du foie gras d'oie sur la fonte mesurée après stérilisation à 104°C. *Science des Aliments*. 10 : 543-554.

**Blum, J. C., Salichon, M. R.; Guy, G., Rousselot-Pailley, D.** 1992. Comparative development, chemical composition and quality of ducks and goose 'foie gras' obtained by cramming. *In : XIX World's Poultry Congress*. WPSA, Amsterdam, Netherlands, 240-244.

**Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., Rossignol, M., Jauneau, A., Boudart, G., Monsarrat, B., Esquerré-Tugayé, M. T., Boudet, A., Pont-Lezica, R.** 2003. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis*. 24, 3421-3432.

**Boström, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frohman, M.A., Borén, J., Olofsson, S.O.** 2005. Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 25 : 1945-1951.

**Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B.R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Boren, J., Olofsson, S.O.** 2007. SNARE

proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nature Cell Biology*. 9 : 1286-1293.

**Bouillier-Oudot, M., Leprettre, S., Dubois, J. P., Babilé, R.** 2002. Itinéraires *post mortem* et caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras d'oies. 5<sup>èmes</sup> *Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Pau, France. 172-175.

**Bouillier-Oudot, M., Leprettre, S., Dubois, J. P., Babilé, R.** 2004. Evolution de la composition hépatique lors du refroidissement *post mortem* de foies gras d'oies dans la carcasse. 6<sup>èmes</sup> *Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Arcachon, France. 203-206.

**Bouillier-Oudot, M., Leprettre, S., Laurent, N., Dubois, J. P., Babilé, R.** 2006. Caractéristiques histologiques des foies gras d'oies : relations avec les performances, la composition et la qualité des foies crus et cuits. 7<sup>èmes</sup> *Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Arcachon, France. 136-139.

**Bouillier-Oudot, M., Dubois, J. P., Auvergne, A., Babilé, R., Fernandez, X.** 2008. Incidence du rythme de gavage et du sexe sur les performances zootechniques d'oies et les caractéristiques chimiques, histologiques et technologiques des foies gras. 8<sup>èmes</sup> *Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Arcachon, France. 131-134.

**Bouyssié, D., Gonzales de Peredo, A., Mouton, E., Albigot, R., Roussel, L., Ortega, N., Cayrol, C., Burlet-Schiltz, O., Girard, J.P., Monsarrat, B.** 2007. Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate and quantify proteomics data generated by ICAT and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. *Molecular and Cellular Proteomics*. 6 (9) : 1621-1637.

**Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 : 248-254.

**Butterwith, S. C.** 1988. Avian adipose tissue: growth and development. *In: Leanness in domestic birds: Genetic, metabolic and hormonal aspects.* Leclercq, B. et Whitehead, C. C. (Eds.), Butterworths, London, 203-222.

**Castaing, J., Robin, N.** 1990. Alimentation énergétique du canard mulard. *Revue d'Alimentation Animale.* 440 : 22-25.

**Cazeils, J. L.** 2000. Caractérisation de la composition lipidique des membranes plasmiques des hépatocytes des foies d'oies : relation avec le rendement technologique des foies gras. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. 192p.

**Cazeils, J. L., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., Babilé, R.** 1999a. Influence de la composition biochimique de la membrane plasmique des hépatocytes sur le rendement après stérilisation des foies gras d'oies. *Revue de Médecine Vétérinaire.* 150 (7) : 651-654.

**Cazeils, J. L., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., Candau, M., Babilé, R.** 1999b. Lipid composition of hepatocyte plasma membranes from geese overfed with corn. *Lipids.* 34 (9) : 937-942.

**Chartrin, P., Bernadet, M. D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J. F., Rideau, N., Duclos, M. J., Baéza, E.** 2006. Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in duck. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 145A : 390-396.

**Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujimoto, T.** 2009. Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochemistry and Cell Biology* 132 : 281-291.

**Chunchun, H., Jiwen, W., Hengyong, X., Liang, L., Jianqiang, J., Li, J., Weihua, Z.** 2008. Effect of overfeeding on plasma parameters and mRNA expression of genes associated with hepatic lipogenesis in geese. *Asian - Australian Journal of Animal Science.* 21 (4) : 590-595.

**Ciapaite, J., van der Broek, N. M., Brinke, H., Nicolay, K., Jeneson, J. A., Houten, S. M., Prompers, J. J.** 2011. Differential effects of short- and long-term high-fat diet on hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1811 : 441-451.

**Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foies Gras (CIFOG).** 2011. Assemblée générale du 24 juin 2011. Rapport économique de l'année 2010. 75p.

**Cooper, R. A., Strauss, J. F.** 1984. Regulation of cell membrane cholesterol. *In* : "Physiology of membrane fluidity", Vol. 1 (Ed. Shinitzky, M.), pp. 73-97. CRC Press, Boca Raton.

**Cooper, D. A., Lu, S. C., Viswanath, R., Freiman, R. N., Bensadoun, A.** 1992. The structure and complete nucleotide sequence of the avian lipoprotein lipase gene. *Biochemistry and Biophysical Acta*. 1129 : 166-171.

**Dalrymple, R. H., Hamm, R.** 1973. A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *Journal of Food Technology*. 8 : 439-444.

**Davail, S., Guy, G., André, J. M., Hermier, D., Hoo-Paris, R.** 2000. Metabolism in two breeds of geese with moderate or large overfeeding induced liver steatosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 126A : 91-99.

**Davail, S., Rideau, N., Guy, G., André, J. M., Hermier, D., Hoo-Paris, R.** 2003. Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 134A : 707-715.

**Dubois, J. P., Auvergne, A., Babilé, R., Verdier, M., Leprettre, S., Lavigne, F., Vieillecroze, D.** 1996. Le point sur les facteurs d'amélioration de la production d'oies gavées. *In*: 2<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Bordeaux, France. 89-92.

**Dumas, P., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J.** 2007. Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications? *Trends in Biotechnology*. 25 : 40-44.

**Etherington, D. J., Sims, T. J.** 1981. Detection and estimation of collagen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 32 (6) : 539-546.

**Evans, A. J.** 1972. *In vitro* lipogenesis in the liver and adipose tissue of the female Aylesbury duck at different stages. *British Poultry Science*. 13 : 595-602.

**Fernandez, X., Lahirigoyen, E., Bouillier-Oudot, M., Vitezica, Z., Auvergne, A.** 2009. The effects of stunning methods on product qualities in force-fed ducks and geese. 2. Fatty liver quality. *Animal*. 4 (1) : 139-146.

**Fernandez, X., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Bernadet, M. D., Manse, H.** 2011. Duration of transport and holding in lairage at constant postprandial delay to slaughter – Effects on fatty liver and breast muscle quality in mule ducks. Accepté pour publication dans *Poultry Science*.

**Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226 : 497-509.

**Fournier, E., Peresson, R., Guy, G., Hermier, D.** 1997. Relationships between storage and secretion of hepatic lipids in two breeds of geese with different susceptibility to liver steatosis. *Poultry Science*. 76 : 599-607.

**Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y.** 2008. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology*. 130 : 263-279.

**Fukumoto, S., Fujimoto, T.** 2002. Deformation of lipid droplets in fixed samples. *Histochemistry and Cell Biology*. 118 : 423-428.

**Gabarrou, J. F., Salichon, M. R., Guy, G., Blum, J. C.** 1996. Hybrid ducks overfed with boiled corn develop an acute hepatic steatosis with decreased choline and

polyunsaturated fatty acid level in phospholipids. *Reproduction Nutrition Development*. 36 : 473-484.

**Gazi, E., Gardner, P., Lockyer, N. P., Hart, C. A., Brown, M. D., Clarke, N. W.** 2007. Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *Journal of Lipid Research*. 48 : 1846-1856.

**Goodridge, A.G.** 1987. Dietary regulation of gene expression: enzymes involved in carbohydrates and lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 7 : 157-185.

**Goullieux, I.** 2007. Recensement et évaluation des méthodes de mesure du taux de fonte et du rendement. *Viandes et Produits Carnés*. 26 (5) : 147-151.

**Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Fisher, R. M., Hamsten, A., Auvinen, P., Yki-Järvinen, H.** 2008. Gene expression in human NAFLD. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 294 : 1281-1287.

**Griffin, H., Grant, G., Perry, M.** 1982. Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins for immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase *in vitro*. *The Biochemical Journal*. 206 : 647-654.

**Guerra, A.** 2011. Analyse métabolomique et qualité des foies gras. Identification des caractéristiques métaboliques contribuant à la variabilité de la qualité du foie gras de canard. Rapport de stage de Master 2 Recherche 'Elaboration de Qualité et Sécurité Alimentaire'.

**Guy, G., Hermier, D., Davail, S., Bely, M., André, J. M., Hoo-Paris, R.** 1999. Meat production and force-feeding ability of different types of ducks. *In: 1<sup>st</sup> World Waterfowl Symposium*. Taichung, Taiwan. 462-468.

**Han, C., Wang, J., Xu, H., Li, L., Ye, J., Jiang, L., Zhuo, W.** 2008. Effect of overfeeding on plasma parameters and mRNA expression of genes associated with hepatic lipogenesis in geese. *Asian Australian Journal of Animal Science*. 21 (4) : 590-595.

**Hayes, T. L., Lindgren, F. T., Gofman, J. W.** 1963. A quantitative determination of the osmium tetroxide – lipoprotein interaction. *The Journal of Cell Biology*. 19 : 251-255.

**Hérault, F., Saez, G., Robert, E., Al Mohammad, A., Davail, S., Chartrin, P., Baéza, E., Diot, C.** 2009. Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Animal Genetics*. 41 : 12-20.

**Hermier, D., Forgez, P., Laplaud, P. M., Chapman, M. J.** 1988. Density distribution and physicochemical properties of plasma lipoproteins and apolipoproteins in the goose, *Anser anser*, a potential model of liver steatosis. *Journal of Lipid Research*. 29 : 893-907.

**Hermier, D., Saadoun, A., Salichon, M. R., Sellier, N., Rousselot-Paillet, D., Chapman, J.** 1991. Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: changes induced by development and force-feeding. *Lipids*. 26 : 331-339.

**Hermier, D., Mourot, J., Guy, G., Peiniau, P.** 1998. Lipogénèse hépatique et aptitude à la production de foie gras chez l'oie. In: 3<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Bordeaux, France. 37-40.

**Hermier, D., Salichon, M. R., Guy, G., Peresson, R.** 1999a. Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in the goose. *Poultry Science*. 78 : 1398-1406.

**Hermier, D., Salichon, M. R., Guy, G., Peresson, R., Mourot, J., Lagarrigue, S.** 1999b. La stéatose hépatique des palmipèdes gavés : bases métaboliques et sensibilité génétique. *INRA Productions Animales*. 12 : 265-274.



**Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J. M., Hoo-Paris, R.** 2003. Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of duck. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 135B : 663-675.

**Héron, S., Maloumbi, M. G., Dreux, M., Verette, E., Tchalpa, A.** 2007. Method development for a quantitative analysis performed without any standard using an evaporative light scattering detector. *Journal of Chromatography A*. 1161 : 152-156.

**Hocquette, J. F., Bauchard, D.** 1999. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acid preruminant and ruminant animals. *Reproduction Nutrition Development*. 39 : 27-48.

**Iff, J., Wang, W., Sajic, T., Oudry, N., Gueneau, E., Hopfgartner, G., Varesio, E., Szanto, I.** 2009. Differential proteomic analysis of STAT6 knockout mice reveals new regulatory function in liver lipid homeostasis. *Journal of Proteome Research*. 8 : 4511-4524.

**Jeacocke, R.** 1977. Continuous measurements of the pH of beef muscle in intact beef carcass. *Journal of Food Technology*. 12 : 375-386.

**Jimenez-Lopez, J. M., Carrasco, M. P., Segovia, J. L., Marco, C.** 2003. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine synthesis via both the methylation of phosphatidylethanolamine and CDP-choline pathways in HepG2 cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36 : 153-161.

**Jo, C., Ahn, D.U.** 1999. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poultry Science*. 77 : 475-480.

**J.O.C.E.** 1971. Dosage de l'humidité. *Journal Officiel des Communautés Européennes*. L 279/8.

**Journal Officiel de la République Française.** 1993. Décret n° 93-9-99 du 09-08-93 du JO du 14-08-93, relatif aux préparations à base de foie gras.

**Kileh-Wais, M., Elsen, J. M., Feve, K., Vignoles, F., Fernandez, X., Baéza, E., Davail, S., Bastianelli, D., Bernadet, M. D., Dubos, F., Basso, B., Vignal, A., Marie-Etancellin, C.** 2010. Primo-localisation de QTL d'aptitude au gavage et de qualité des produits de canard. In: 9<sup>èmes</sup> Journées de la recherche sur les Palmipèdes à Foies Gras. Bordeaux. 13-16.

**Kirpich, I. A., Gobejishvili, L. N., Bon Homme, M., Waigel, S., Cave, M., Arteel, G., Barve, S. S., McClain, C. J., Deaciuc, I. V.** 2010. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 22 (1) : 38-45.

**Kirschner, C., Ofstad, R., Skarpeid, H. J., Host, V., Kohler, A.** 2004. Monitoring of denaturation processes in aged beef loin by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 : 3920-3929.

**Kristensen, L., Purslow, P. P.** 2001. The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. *Meat Science*. 58 : 17-23.

**Kumar Sharma, A., Bhartu, S., Ojha, S., Bhatia, J., Kumar, N., Ray, R., Kumari, S., Singh Arya, D.** 2011. Up-regulation of PPAR $\gamma$ , heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistances,  $\beta$ -cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*. DOI: 10.1017/S000711451100225X.

**Labie, C., Tournut, J.** 1970. Recherches sur les modifications histologiques et biochimiques chez les oies soumises au gavage. *Cahiers de Médecine Vétérinaire*. 39 : 247-261.

**Labie, C., Bénard, G., Gauclore, B.** 1989. Evolution de la stéatose hépatique chez le canard mulard au cours du gavage. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 140 (8-9), 809.

**Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680-685

**Larzul, C.** 2002a. Genetic parameters for overfed mule duck traits. *In: Proceedings 7th World Congress of Genetic Applied to Livestock Production*. Montpellier, France. Communication 04-08.

**Larzul C.** 2002b. Paramètres génétiques du gavage dans une population de canards communs. *In: 5<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Pau, France. 33-36.

**Latil, G., Auvergne, A., Babilé, R.** 1996. Consommation du canard mulard en gavage. Relations avec les performances zootechniques et la qualité technologique du foie gras. *In: 2<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. Bordeaux, France. 93-97.

**Lawrie, R. A.** 1998. Lawrie's meat science. *Woodhead Publishing limited*. Cambridge, Angleterre.

**Le Naour, F., Bralet, M. P., Debois, D., Sandt, C., Guettier, C., Dumas, P., Brunelle, A., Laprévotte, O.** 2009. Chemical imaging on liver steatosis using synchrotron infrared and ToF-SIMS microspectroscopies. *PLOS ONE*. 4 (10) : 1-10.

**Leclercq, B., Blum, J. C.** 1975. Etude de la suralimentation forcée : effets sur le métabolisme hépatique et les formes de transport hépatiques chez le canard. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. 15 : 559-568.

**Leprettre, S.** 1998. Incidence de facteurs *peri-mortem* sur les qualités technologiques et organoleptiques des foies gras d'oies. Etude des défauts de couleur. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. 194p.

**Leprettre, S., Dubois, J. P., Bouillier-Oudot, M., Babilé, R.** 2002. Technique de gavage des oies : Incidence de la fréquence des repas et de la durée du gavage sur les performances et les caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras. *In: 5<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foies Gras*. Pau, France. 122-125.

**Leveille, G. A., Romsos, D. R., Yeh, Y. Y., O’Hea, E. K.** 1975. Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poultry Science*. 54 : 1075-1093.

**Liu, H., Sadygov, R. G., Yates, J.** 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical Chemistry*. 76 (14) : 4193-4201.

**Liu, X. Y., He, R. G., Huang, C. S., Li, X., Zhou, Q. A., Wang, C., Zhao, N., Zhou, S. X.** 2006. Hepatic lipogenesis associated with biochemical changes in overfed Landaise geese and china Xupu geese. *Agricultural Sciences in China*. 5 (5): 390-396.

**Locsmándi, L., Romvári, R., Bogenfürst, F., Szabo, A., Molnár, M., Andrásy-Baka, A., Horn, P.** 2005. *In vivo* studies on goose liver development by means of computer tomography. *Animal research*. 54 : 43-54.

**Locsmándi, L., Hegedüs, G., Andrásy-Baka, F., Bogenfürst, F., Romvári, R.** 2007. Following the goose liver development by means of cross-sectional digital imaging, liver histology and blood biochemical parameters. *Acta Biologica Hungarica*. 58 (1) : 35-48.

**Lopez-Bote, C. J., Toldra, F., Daza, A., Ferrer, J. M., Menoyo, D., Silio, L., Rodriguez, M. C.** 2008. Effect of exercise on skeletal muscle proteolytic enzyme activity and meat quality characteristics in Iberian pigs. *Meat Science*. 79 : 71-76.

**Lynch, S. M., Frei, B.** 1993. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low-density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*. 34 (10) : 1745-1751.

**Marie-Etancelin, C., Larzul, C., Mialon-Richard, M. M., Brun, J. M.** 2006. Génétique du canard mulard : Synthèse bibliographique. Paramètres génétiques dans les populations parentales. In: 6<sup>èmes</sup> Journées de la recherche sur les Palmipèdes à Foies Gras. Arcachon, France. 33-36

**Marie-Etancelin, C., André, J. M., Baéza, E., Basso, B., Bastianelli, D., Bernadet, M. D., Brun, J. M., Davail, S., Dubos, F., Fernandez, X., Guéméné, D., Gontier, K., Guy, G., Legarra, A.** 2008. Paramètres génétiques d'indicateurs du métabolisme hépatique durant le gavage, de la qualité des produits et du taux de corticostérone chez le canard, estimés dans le cadre du programme "Genecan". In: 8<sup>èmes</sup> Journées de la recherche sur les Palmipèdes à Foies Gras. Arcachon, France. 33-36.

**Marie-Etancelin, C., Basso, B., Davail, S., Gontier, K., Fernandez, X., Vitezica, Z., Bastianelli, D., Baéza, E., Bernadet, M. D., Guy, G., Brun, J. M., Legarra, A.** 2011. Genetic parameters of product quality and hepatic metabolism in fattened mule ducks. *Journal of Animal Science*. 89 (3) : 669-679.

**Mayes, P. A.** 1996. Biosynthèse des acides gras. In : *Précis de biochimie de Happer*. Murray, K. M., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (Eds), De Boeck Université, 241-249.

**Mc Donough, P. M., Agustin, R. M., Ingermanson, R. S., Loy, P. A., Buehrer, B. M., Nicoll, J. B., Prigozhina, N. L., Mikic, I., Price, J. H.** 2009. Quantification of lipid droplets and associated proteins in cellular models of obesity via content / high throughput microscopy and automated image analysis. *Assay and Drug Development Technologies*. 7 (5) : 440-460.

**Melody, J. L., Lonergan, S. M., Rowe, L. J., Huiatt, T. W., Mayes, M. S., Huff-Lonergan, E.** 2004. Early *postmortem* biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *Journal of Animal Science*. 82 : 1195-1205.

**Mercier, Y., Gatellier, P., Viau, M., Rémignon, H., Renerre, M.** 1998. Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Science*. 48 (4) : 301-318.

**Meunier, B., Bouley, J., Picc, I., Bernard, C., Picard, B., Hocquette, J. F.** 2005. Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 340 : 226-230.

**Mignon-Grasteau, S., Beaumont, C., Poivey, J. P.** 1998. Estimation of the genetic parameters of sexual dimorphism of body weight in 'label' chicken and Muscovy ducks. *Genetics Selection Evolution*. 30 : 481-491.

**Miller, L. M., Dumas, P.** 2006. Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1758 : 846-857.

**Molee, W., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., Babilé, R.** 2005. Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 141B : 437-444.

**Molee W.** 2006. Facteurs de variation de la composition lipidique des membranes plasmiques des hépatocytes chez les palmipèdes : Relation avec le rendement technologique des foies gras. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. 146p.

**Molly, K., Deymeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M., Geenen, I.** 1997. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chemistry*. 59 : 539-545.

**Morzel, M., Chambon, C., Lefèvre, F., Paboeuf, G., Laville, E.** 2006a. Modification of trout (*Oncorhynchus mykiss*) by preslaughter activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 : 2997-3001.

**Morzel, M., Terlouw, C., Laville, E.** 2006b. Relations entre le métabolisme *post mortem* et les qualités des viandes : Apport de la protéomique. In: *11<sup>èmes</sup> Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la Viande*. Clermont-Ferrand, France. 191-195.

**Mourot, J., Guy, G., Lagarrigue, S., Peiniau, P., Hermier, D.** 2000. Role of hepatic lipogenesis in the susceptibility to fatty liver in the goose (*Anser anser*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 126B : 81-87.

**Myher, J. J., Kuksis, A.** 1984. Determination of plasma total lipid profiles by capillary gas-liquid chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 10 : 13-23.

**Neuschwander-Tetri, B. A.** 2001. Betaïne : an old therapy for a new scourge. *American Journal of Gastroenterology*. 96 : 2534-2536.

**Nir, I., Nitsan, Z., Vax, A.** 1973. The influence of force-feeding and of protein supplementation to the diet on the metabolisable energy of diets, digestibility of nutrients, nitrogen retention and digestive enzymes output in geese. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 13 : 465-479.

**Nir, I., Nitsan, Z.** 1976. Goose fatty liver composition as related to degree of steatosis, nutritional and technological treatments, and simplified method for quality estimation. *Annales de Zootechnie*. 25 : 461-470.

**Nitsan, Z., Nir, I., Dror, Y., Bruckental, I.** 1973. The effect of forced feeding and of dietary protein level on enzymes associated with digestion, protein and carbohydrate metabolism in geese. *Poultry Science*. 52 : 474-481.

**Numa, S.** 1984. Fatty acid metabolism and its regulation. *Elsevier, Amsterdam*. pp : 222.

**Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujita, A., Fujimoto, T.** 2009. Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: From the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791 : 399-407.

**Oliver, C. N., Alin, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., Stadtman, E. R.** 1987. Age related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 262 : 5488-5491.

**Pan, Z., Wang, J., Han, C., Zhai, N., Lv, J., Zhou, Z., Tang, H., Xiang, S., Wang, J., Li, L.** 2010. Identification of differentially expressed genes between hepatocytes of Landes geese (*Anser anser*) and Sichuan White geese (*Anser cygnoides*). *Molecular Biology Reports*. 37 : 4059-4066.

**Petit, V. W., Réfrégiers, M., Guettier, C., Jamme, F., Sebanayakam, K., Brunelle, A., Laprèvote, O., Dumas, P., Le Naour, F.** 2010. Multimodal spectroscopy combining time-of-flight-secondary ion mass spectrometry, synchrotron-FT-IR, and synchrotron-UV microspectroscopies on the same tissue section. *Analytical Chemistry*. 82 : 3963-3968.

**Picgirard, L.** 2010. Cuisson industrielle des viandes : Mécanismes et contraintes. *Viandes et Produits Carnés*. 27 (6) : 192-196.

**Poujardieu, B., Guichard, F., Laventure, P.** 1994. Paramètres génétiques de croissance et de gavage de la cane commune. *Genetics Selection Evolution*. 26 : 468-472.

**Rasband, W. S.** ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009.

**Rauch, P., Kas, J.** 1983. Effect of ATP level and its metabolic turnover in liver on proteosynthesis *postmortem*. *Experimental and Molecular Pathology*. 39 (1) : 37-42.

**Rennerre, M., Dumont, F., Gatellier, P.** 1996. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Science*. 43 (2) : 111-121.

**Rennerre, M., Poncet, K., Mercier, Y., Gatellier, P., Metro, B.** 1999. Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscles of turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 : 237-244.

**Riesmersma, J. C.** 1968. Osmium tetroxide fixation of lipids for electron microscopy. A possible reaction mechanism. *Biochimical et Biophysica Acta*. 152 : 718-727.

**Roncalés, P., Geesink, G., Van Laack, R. L. J. M., Jaime, I., Beltràn, J. A., Barnier, V., Smulders, F. S. M.** 1995. In : Ouali, A., Smulders, F. S. M. Demeyers, D. Editors, *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*. ECCEAMST, Utrecht, 311p.



**Rousselot-Pailley, D., Guy, G., Gourichon, D., Sellier, N., Blum, J. C.** 1992. Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA Productions Animales*. 5 : 167-172.

**Rousselot-Pailley, D., Rouvier, R., Bartel, G.** 1993. Méthodologie du test de fonte des foies gras. In: *1<sup>ères</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. 29 avril 1993. Bordeaux. 75-85.

**Roussely, M., Guichard, F., Sazy, E.** 1993. Performances zootechniques et qualité des produits du canard mulard: Analyse de la variabilité individuelle. In: *1<sup>ères</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*. 29 avril 1993. Bordeaux. 89-105.

**Saadoun, A., Leclercq, B.** 1983. Comparison of *in vivo* fatty acid synthesis of the genetically lean and fat chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 75B : 641-644.

**Saadoun, A., Leclercq, B.** 1987. *In vivo* lipogenesis of genetically lean and fat chicken: effects of nutritional state and dietary treatment. *Journal of Nutrition*. 117 : 428-435.

**Saez, G., Baéza, E., Davail, S., Durand, D., Bauchart, D., Gruffat, D.** 2008a. Hepatic metabolism of glucose and linoleic acid varies in relation to susceptibility to fatty liver in *ad libitum* fed Muscovy and Pekin ducks. *The British Journal of Nutrition*. 101 : 1-8.

**Saez, G., Baéza, E., Davail, S., Durand, D., Bauchart, D., Gruffat, D.** 2008b. Is the hepatic metabolism of glucose and linoleic acid influenced by species in overfed ducks ? *Comparative Biochemistry and Physiology*. 151A : 576-81.

**Saez, G.** 2009. Relation entre l'engraissement intramusculaire chez le canard, la lipogénèse hépatique, la sécrétion hépatique des lipides et la capacité de captage des lipides par les muscles. Thèse de Doctorat, Université de Pau et Pays de l'Adour, 146p.

**Saez, G., Davail, S., Gentès, G., Hocquette, J. F., Jourdan, T., Degrace, P., Baéza, E.** 2009. Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks. *Poultry Science*. 88 : 2382-2391.

**Salichon, M. R., Guy, G., Peresson, R., Hermier, D.** 1997. Hepatic lipid metabolism in relation to fatty liver production in the goose. *In: 11<sup>th</sup> European Symposium on Waterfowl*. Nantes, France, 587-593.

**Sauvant, D., Perez, J. M., Tran, G.** 2004. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage : porcs, volailles, bovins, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons. INRA éditions, 301p.

**Sauveur, B.** 1988. Reproduction des volailles et production d'oeufs. INRA éditions, 449p.

**Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., Cherel, P., Laville, E.** Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranous muscle: Implications on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (7) : 2732-2737.

**Setiawan, A.** 1994. Etudes comparatives de différents types génétiques de canards mulards: croissance, composition corporelle et tissulaire, et qualité des produits obtenus avant et après gavage. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 274p.

**Shacter, E.** 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*. 32 : 307-326.

**Stabursvik, E., Martens, H.** 1980. Thermal denaturation of proteins in *post rigor* muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Science Food and Agriculture*. 31 : 1034-1042.

**Thiele, C., Spandl, J.** 2008. Cell biology of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology*. 20: 378-385.

**Tornberg, E.** 2005. Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*. 70 : 493-508.

**Torres, D. M., Harrison, S. A.** 2008. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 134 : 1682-1698.

**Woessner, J. F. Jr.** 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 93 : 440-447.

**Yamaguchi, M.** 2000. Role of regucalcin in calcium signaling. *Life Sciences*. 66 (19) : 1769-1780.

**Yamaguchi, M., Kanayama, Y.** 1995. Enhanced expression of calcium binding protein regucalcin mRNA in regenerating rat liver. *Journal of Cellular Biochemistry*. 57 (2) : 185-190.

**Zhu, M., Smith, J. W., Huang, C. M.** 2010. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2010/840518.

**Zhu, L. H., Meng, H., Duan, X. J., Xu, G. Q., Zhang, J., Gong, D. Q.** 2011. Gene expression profile in the liver tissue of geese after overfeeding. *Poultry Science*. 90 : 107-117.





## The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck “foie gras”

L. Théron <sup>a,b,c,\*</sup>, T. Astruc <sup>d</sup>, M. Bouillier-Oudot <sup>a,b,c</sup>, C. Molette <sup>a,b,c</sup>, A. Vénien <sup>d</sup>, F. Peyrin <sup>d</sup>, Z.G. Vitezica <sup>a,b,c</sup>, X. Fernandez <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>b</sup> Université de Toulouse, INPT, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème Métabolisme, ENSAT, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>c</sup> ENVT, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

<sup>d</sup> INRA, UR 370 QuaPA, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 October 2010

Received in revised form 9 March 2011

Accepted 18 April 2011

#### Keywords:

“Foie gras” quality

Technological yield

Lipid droplets

Microscopy

Histology

Fatty liver

### ABSTRACT

Fat loss during cooking of duck “foie gras” is the main quality issue in processing plants. To better understand this phenomenon, a histological and ultrastructural study was conducted. The aim was to characterize changes in lipid droplets of duck “foie gras” related to fat loss during cooking. Ten fatty livers were sampled before and after cooking and prepared for optical and transmission electron microscopy. In raw livers, the lipid droplets were nearly spherical while after cooking, they were larger and lost their spherical shape. We also observed a decrease in the number of droplets after cooking, probably due to droplet fusion caused by the heat treatment. Before cooking, there were fewer lipid droplets and a higher osmium tetroxide staining intensity in the fatty liver, which later gave a lower technological yield. Fat loss during cooking was higher when there was more fusion of lipid droplets before cooking.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

France is the main producer (73%) of “foie gras” (fatty liver) in the world. French “foie gras” is a traditional product, a coveted dish with a strong added value. The technological yield is the principal quality trait and it is evaluated by the loss of fat during cooking. This fat loss constitutes a recurring problem for the industry and consumers because it influences the uniformity of the finished product and in the profitability of a sales unit. A maximum value of 30% of fat loss during cooking is imposed by market regulation (*Journal Officiel de la République Française*, 1993). There is a strong inter-individual variability in the processing ability of fatty liver. Under controlled experimental conditions, the coefficient of variation of fat loss is usually around 50% (Fernandez, personal communication) and it is expected to be higher under less controlled commercial conditions. Under industrial production, a standard practice to reduce the variability of fat loss consists in processing only a part of the livers, chosen on the basis of fresh weight. There is indeed a clear relationship between liver weight and technological yield (Rousselot-Pailley, Guy, Gourichon, Sellier, & Blum, 1992). Despite this, the variability in the technological quality is still high. Other factors are

known to have an impact on the fat loss during cooking: the rate of food delivery during force-feeding (Latil, Auvergne, & Babilé, 1996), the state of repletion of ducks before slaughter (Baudonnet-Lenfant, Auvergne, & Babilé, 1991) and the conditions of evisceration or the chilling of the products (Bouillier-Oudot, Leprettre, Dubois, & Babilé, 2002; Rousselot-Pailley et al., 1992).

Unlike mammals, where the accumulation of lipids in the liver is a pathological steatosis, in avian species, lipogenesis is induced by dietary carbohydrates (Evans, 1972; Saadoun & Leclercq, 1987). Despite the apparent similarity with the mammalian liver tissue steatosis, fatty liver induced by over-feeding is more pronounced in birds where the repartition of lipid droplets is closer to the characteristics of adipocytes (Delarue & Laumonier, 1969). The accumulation of fat leads to the appearance of lipid droplets which may represent individually more than one tenth of the hepatocyte (Bouillier-Oudot, Leprettre, Laurent, Dubois, & Babilé, 2006). A recent study showed that lipid droplet size distribution is linked to technological yield of geese “foie gras” (Bouillier-Oudot, Dubois, Auvergne, Babilé, & Fernandez, 2008).

Despite the efforts of the processing industry to control fat loss, the variability of fatty liver cooking yields remains high and uncontrolled. The objectives of this study were to establish links between the morphological characteristics of individual lipid droplets and the technological quality of fatty liver, to better understand the mechanisms underlying fat loss during cooking. In order to study the relationship between lipid droplet size distribution and technological yield in mule

\* Corresponding author at: INRA, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France. Tel.: +33 5 34 32 39 00; fax: +33 5 34 32 39 01.

E-mail address: [laetitia.theron@ensat.fr](mailto:laetitia.theron@ensat.fr) (L. Théron).

ducks, we developed a method that enables each individual droplet to be characterized in terms of area, circularity, and grey level, before and after cooking.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals, breeding, overfeeding and slaughter

Male mule ducks (*Cairina moschata* × *Anas platyrhynchos*) were reared collectively until the age of 13 weeks in a poultry house under natural conditions of light and temperature at the Agricultural College of Périgueux (EPLEPPA, 24, France) following standard practices (Molee, Bouillier-Oudot, Auvergne, & Babilé, 2005). Animals were then overfed in individual cages during 12 days, by the distribution of a soaked-corn mixture (42% grain–58% flour) twice a day. Ducks were slaughtered in the experimental slaughterhouse of the Agricultural College of Périgueux, 10 h after the last meal. The poultry house and the abattoir were located on the same place. Birds were crated in transport modules of 4 birds each and transported (5 min) to the slaughter point, by groups of 20 (5 crates). The first bird was slaughtered immediately after arrival and the 20th about 40 min later (slaughter rate was of 1 bird every 2 min). Birds were electrically stunned head-only using scissor tongs, bled by ventral cutting of neck vessels. After a 5 min bleeding, the carcasses were scalded and plucked.

### 2.2. Fatty liver processing and sampling

Livers were taken at the end of the slaughter process, 20 min after bleeding. Livers were chilled on ice for 6 h and carefully trimmed of their main blood vessels. Each fatty liver was then transversally divided in three parts, each of which includes the two lobes. One of these three parts was adjusted on a weight at 200 g and was placed into a glass can for further processing. Indeed, the processing of the entire 'foie gras' pasteurized consists of the cooking of non mixed and individual fatty livers taken in the middle parts of each of the two lobes. The extremities of the lobes are used in the processing of fatty liver emulsion. Salt (12 g/kg) and pepper (2 g/kg) were added and the cans were cooked for 1 h in water in an autoclave ('Brouillon Process', Sainte Bazeille, France) at 85 °C under a pressure of 0.8 bar, to obtain a pasteurization value of 170. Temperature was controlled in the water and in two control cans equipped with temperature sensors. After 30 min of chilling (circulating cool water), the cans were stored at 4 °C for 2 months. The cans were opened and all visible external fat was carefully removed by scrapping the surface of the liver with a knife. The technological yield was evaluated by the expression of fat loss during cooking as a percentage of initial liver weight:

$$\text{Technological yield} = (\text{cooked liver weight trimmed of all visible fat} / \text{raw liver weight}) * 100.$$

Total lipids were extracted from the raw fatty livers by homogenization in chloroform-methanol 2/1 (v/v) and measured gravimetrically according to Folch, Lees, and Sloane Stanley (1957). All collected samples for biochemistry analysis were stored at –80 °C prior to analysis.

The sampling for histological analysis was performed on a sub-group of 10 fatty livers chosen on the basis of the technological yield. Four livers were selected in the group showing low technological yield (<68%) and 6 others in the group showing high technological yield (>83%). The corresponding fatty liver weights, technological yield and lipid content are shown in Table 1. The sampling for structure analysis was performed at two times of processing: 20 min post mortem, and 2 months after cooking after opening the cans. Before cooking, the samples were taken on the external part of the big lobe, between the middle and the bottom. After cooking, the sampling was made in the center of the middle slice. The liver samples were immediately

**Table 1**

Technological and biochemical characteristics of the 10 fatty livers, according to the fat loss during cooking.

	High fat loss	Low fat loss	
Fatty liver weight (g)	639.8 ± 57.1	549.5 ± 81.6	NS
Technological yield (%)	64.8 ± 2.4	86.3 ± 2.5	p < 0.0001
Lipid content (%)	60.0 ± 0.83	57.9 ± 2.2	NS

immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 maintained at 0 °C in melting ice. Samples were kept in this solution at 4 °C until use.

### 2.3. Sample preparation for microscopy

For every fatty liver and at each time of processing, a sample of about 45 mm<sup>3</sup> (3 × 3 × 5 mm) was taken and fixed at 4 °C by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Small disks of about 1.5 mm in diameter and 0.2 mm in thickness were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 24 h at 4 °C. The disks were dehydrated through short times (5 min) of a graded series of ethanol and propylene oxide and then embedded in epoxy resin (TAAB, Eurobio, France).

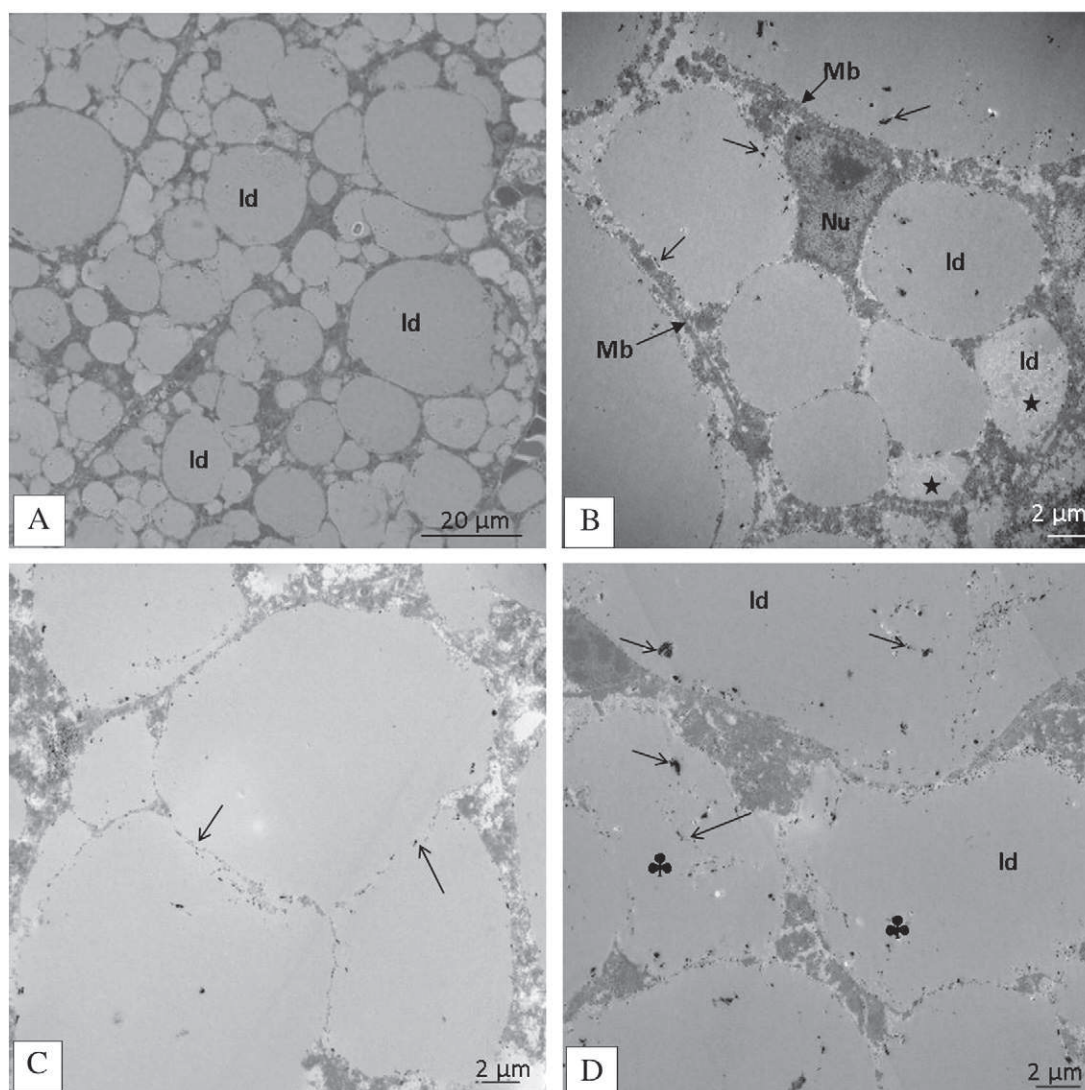
Semi-thin sections (1 µm) of all the 10 samples were immersed together during 10 min in a 1% toluidine blue bath maintained at 60 °C to stain the whole sections in standardized conditions. Numerical images were obtained using an Olympus BX61 transmission bright field/fluorescence microscope coupled to a digital acquisition kit (digital camera Olympus DP 71 and Olympus Cell F software). For each sample, ten juxtaposed images were acquired at the same magnification (×60 oil immersion objective).

Ultra-thin sections (90 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963), and observed with a Hitachi transmission electron microscope (HM 7650) using an 80 kV acceleration voltage. Micrographs were made using a Hamamatsu AMT numeric camera system coupled with the microscope. The sample preparation was done at the Electron Microscopy laboratory of INRA (Theix, France) and observations at the Imaging Cellular Center for Health (CICS) of the University of Clermont-Ferrand (France).

### 2.4. Image analysis

The image analysis software ImageJ (1.42q Rasband, 1997–2009) was used to evaluate the area, the grey level and the circularity index of each lipid droplet from the numerical images of the semi-thin sections. For this purpose, a method of image analysis was developed on 8 bit grey leveled images: RGB images were converted to grayscale using the formula grey = (red + green + blue) / 3. The grey scale ranges extend from 0 (black) to 255 (white). The image analysis included operations of manual labeling, automatic thresholding, and morphological measuring. For each numerical object labeled, i.e. droplet, the area estimation was based on pixels number count, the coloration intensity corresponded on an 8 bit grey level mean value and the circularity index was calculated as the ratio between diameter and perimeter: circularity = 4π(area/perimeter<sup>2</sup>). The circularity index can take values between 0 and 1, 1 indicating a perfect circle. It is known that osmium tetroxide preferentially binds to the unsaturated bonds of fatty acids and imparts electron density observable with electron microscopy (Adams, Abdulla, & Bayliss, 1967; Hayes, Lindgren, & Gofman, 1963). So we hypothesized that grey levels could represent the degree of unsaturation of fatty acids within the lipid droplets.

To obtain a good sampling and a correct statistical analysis, for each condition (low and high technological yield and before and after cooking) 10 images were analyzed. It represented about 36 lipid droplets per image before cooking and 11 after cooking.



**Fig. 1.** Morphology of lipid droplets in fatty liver of overfed ducks before cooking. A: morphology of lipid droplets observed by light microscopy. Spherical lipid droplets (ld) are included in non lipid material. B, C, D: ultrastructure of hepatocyte cells observed by transmission electron microscopy. B: hepatocyte cell surrounded by plasma membrane (Mb), composed of lipid droplets (ld), nucleus (Nu) and other intracellular material. Certain lipid droplets show heterogeneity of staining (stars) suggesting differences in lipid composition. Materials dense to electron are often located at the droplets periphery (arrows). C and D: growing lipid droplet fusion resulting in larger droplets. Material dense to electron initially located at the droplet periphery could then be found in their interior (clover leaves).

### 2.5. Statistical analysis

All data were analyzed using the R software (R 2.9.2, R development Core Team, 2008) and were reported as mean values  $\pm$  standard error of the mean. The Pearson's chi-squared test was used to analyze the differences between the distributions of the number of lipid droplets within classes according to area.

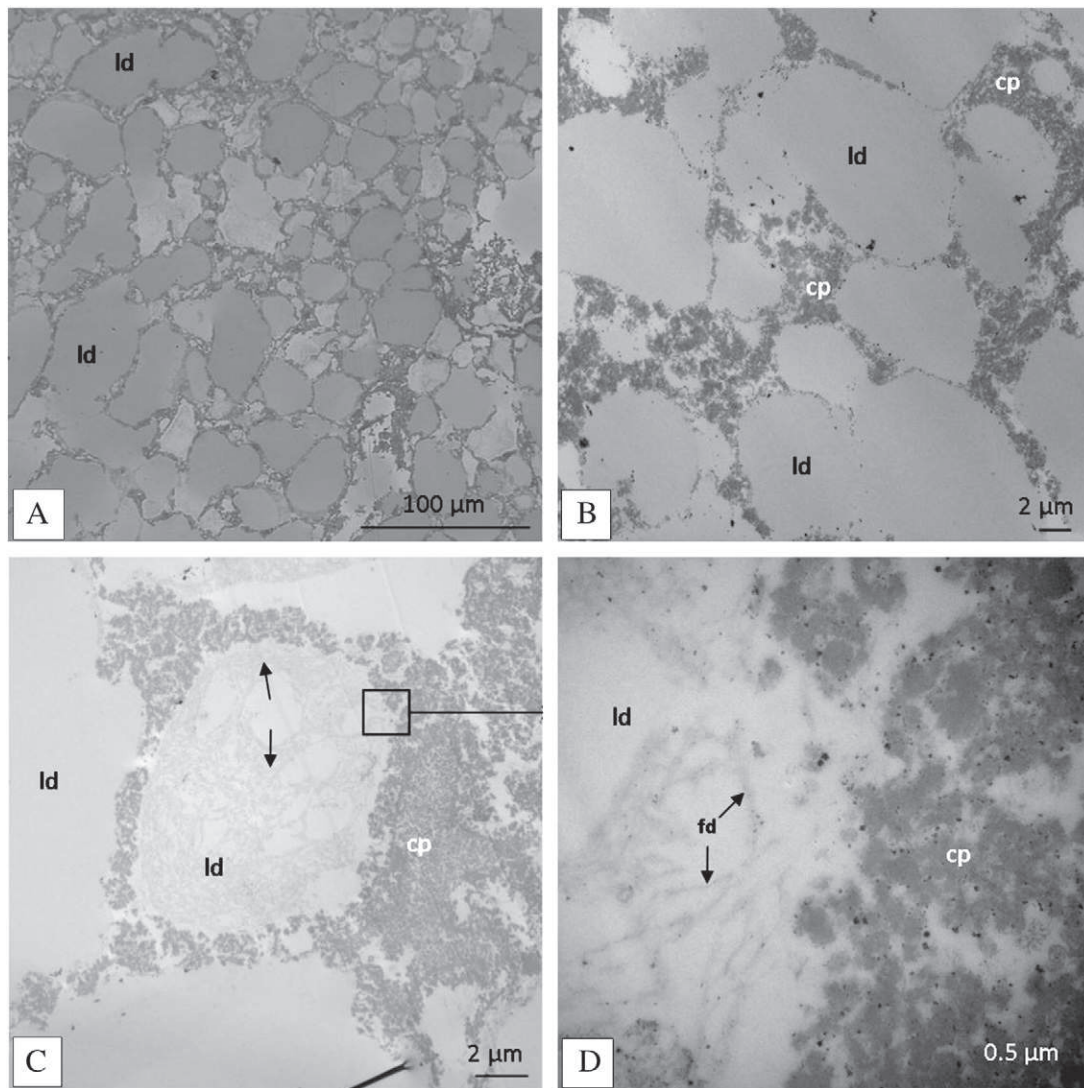
The *t* test was used to determine the differences between grey level and circularity index of lipid droplets. Differences were declared significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Methodological contribution to the study of lipid droplets in fatty liver

In this work, we developed a method able to fix the lipids in the tissue to establish links between the morphological characteristics of individual lipid droplets and the technological quality of duck fatty livers. So far, histological studies of fatty liver were carried out after

fixation with formalin followed by organic solvent dehydration and inclusion in paraffin (Blum & Leclercq, 1973; Bénard & Labie, 1998; Bouillier-Oudot et al., 2006; Locsmándi, Hegedüs, Andrásy-Baka, Bogenfürst, & Romvári, 2007). However, in this type of sample preparation lipid esters are not fixed by formalin but they are eluted by organic solvent during dehydration (Fujimoto, Ohsaki, Cheng, Suzuki, & Shinohara, 2008). Consequently, the lipid droplets of hepatocytes appeared empty. Osmium tetroxide reacts with lipid molecules and makes them insoluble (Riesmersma, 1968), stabilizing the structures and allowing the preservation of the tissue for subsequent stages of preparation of the sample. The content and shape of the lipid droplets do not change after ethanol dehydration when the tissue is fixed with osmium tetroxide (Fukumoto & Fujimoto, 2002). The first step of our work was to test the use of osmium tetroxide in fatty liver samples. The fatty liver tissue has a high fat content (more than 50%) which made its study difficult. Our results showed that filled droplets in the center of the section were gray whereas cut droplets located on the edges of semi-thin section were white (data not shown), suggesting a loss of their lipid content. We concluded that the use of osmium tetroxide fixation method



**Fig. 2.** Morphology of lipid droplets in fatty liver of overfed ducks after cooking. A: lipid droplets (ld) observed by light microscopy are larger after than before heating and have lost their spherical shape. B, C, D: ultrastructure of hepatocyte cells observed by transmission electron microscopy. Intracellular proteins appear coagulated (cp) and the differences in droplet density are confirmed (C). Filamentous deposits (fd) are visible in some lipid droplets as shown in picture C and at a higher magnification in picture D where the morphology of coagulated proteins are more visible.

maintains the lipids in the tissue and allows the observation of intact lipid droplets.

### 3.2. Effect of cooking on lipid droplets morphology

The morphology of lipid droplets before cooking (observed by light and electron microscopy; Fig. 1) revealed spherical forms included in non lipid material, but no membrane (understood as a

bi-layer of phospholipids) could be detected as previously observed by Fujimoto et al. (2008) in lipid droplets isolated from HepG2 cells. Lipid droplets are intracellular storage depots for neutral lipid. The mature lipid droplet consists of a neutral lipid core surrounded by a phospholipid monolayer (Tauchi-Sato, Ozeki, Houjou, Taguchi, & Fujimoto, 2002). The material dense to electron often observed at the periphery (Fig. 1B) might be proteins specially targeted to the lipid droplet surface. The high quantity of lipid droplets in hepatocytes

**Table 2**  
Characteristics of lipid droplets before cooking, at 20 min *post mortem*. Inside the five area classes, the number, grey level and circularity index are displayed according to the fat loss during cooking.

	Fat loss	<320 µm <sup>2</sup>	320–640 µm <sup>2</sup>	640–1280 µm <sup>2</sup>	1280–2560 µm <sup>2</sup>	>2560 µm <sup>2</sup>	
Number	High	1136	217	73	23	5	$p < 0.01$
	Low	1771	236	97	27	2	
Grey level	High	119.4 ± 7.4	113.9 ± 6.2	116.4 ± 4.7	114.1 ± 5.4	117.5 ± 2.8	$p < 0.01$
	Low	125.8 ± 12.1	120.2 ± 8.6	119.6 ± 8.7	122.0 ± 9.6	121.8 ± 6.7	
Circularity index	High	0.677 ± 0.181	0.638 ± 0.207	0.488 ± 0.212	0.341 ± 0.148	0.142 ± 0.053	$p < 0.01$
	Low	0.688 ± 0.168	0.688 ± 0.170	0.586 ± 0.200	0.343 ± 0.161	0.242 ± 0.125	



**Table 3**

Characteristics of lipid droplets after cooking. Inside the six area classes, the number, grey level and circularity index are displayed according to the fat loss during cooking.

Fat loss		<320 $\mu\text{m}^2$	320–640 $\mu\text{m}^2$	640–1280 $\mu\text{m}^2$	1280–2560 $\mu\text{m}^2$	2560–5120 $\mu\text{m}^2$	>5120 $\mu\text{m}^2$	
Number	High	466	65	48	23	22	26	NS
	Low	336	58	33	21	19	11	
Grey level	High	135.7 $\pm$ 12.8	128.9 $\pm$ 14.2	129.0 $\pm$ 15.0	132.7 $\pm$ 12.9	140.1 $\pm$ 10.2	151.0 $\pm$ 5.4	NS
	Low	142.5 $\pm$ 13.4	142.3 $\pm$ 12.2	141.3 $\pm$ 13.0	147.0 $\pm$ 12.0	135.8 $\pm$ 12.1	136.4 $\pm$ 12.7	
Circularity index	High	0.527 $\pm$ 0.198	0.469 $\pm$ 0.221	0.372 $\pm$ 0.207	0.255 $\pm$ 0.122	0.162 $\pm$ 0.070	0.109 $\pm$ 0.024	NS
	Low	0.695 $\pm$ 0.211	0.409 $\pm$ 0.218	0.327 $\pm$ 0.204	0.243 $\pm$ 0.144	0.181 $\pm$ 0.076	0.133 $\pm$ 0.060	

probably exerted a pressure that pushed various organelles such as nuclei to the periphery of the cell (Fig. 1B), as previously observed by electron microscopy in goose fatty liver paraffin sections (Blum & Leclercq, 1973).

After cooking, the observations done by light and electron microscopy (Fig. 2) revealed that lipid droplets were larger and have lost their spherical shape. We observed filamentous deposits in some lipid droplets (Fig. 2C and D). After the lipid droplets fused, the total volume of the lipid core did not change (Boström et al., 2005) and that caused a decrease of the surface to volume ratio and thus an excess of phospholipids (Ohsaki et al., 2009). The filamentous deposits that we observed (Fig. 2C and D) could correspond to phospholipids and denatured proteins in excess incorporated into the core of fused droplets (Ohsaki et al., 2009). The excess of phospholipids could be released or degraded in fatty liver before cooking, and that could explain their absence in our observations before cooking (Fig. 1). Heterogeneity was observed in the droplets staining density, suggesting a difference in composition because of the fixation of osmium tetroxide on unsaturated bonds of fatty acids which imparts electron density observable with electron microscopy (Adams et al., 1967; Hayes et al., 1963). After cooking, non lipid material appeared coagulate (i.e. protein, in Fig. 2B and D). These results are in accordance with those obtained on cooked meat where heating leads to protein denaturation and aggregation (Astruc, Gatellier, Labas, Santé-Lhoutellier, & Marinova, 2010; Tornberg, 2005).

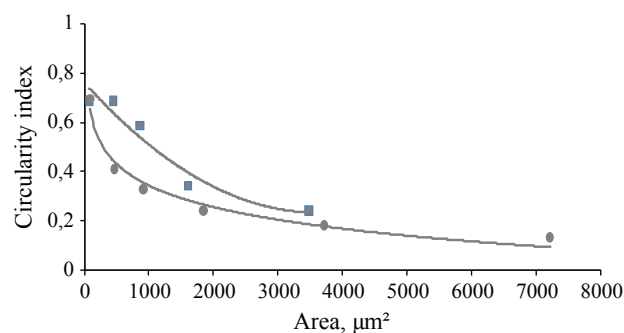
Overall, image analysis has identified more than 8300 lipid droplets, all samples combined: before and after cooking and low and high technological yield. We chose to treat the data by classifying the lipid droplets according to six area classes: lesser than 320  $\mu\text{m}^2$ , between 320 and 640  $\mu\text{m}^2$ , 640 and 1280  $\mu\text{m}^2$ , 1280 and 2560  $\mu\text{m}^2$ , 2560 and 5120  $\mu\text{m}^2$  and greater than 5120  $\mu\text{m}^2$ . We compared the distribution of the number of lipid droplets within classes according to area at 20 min post mortem and after cooking. The results showed an important decrease in the number of small lipid droplets in both groups during heat treatment (Tables 2 and 3). No lipid droplet from fatty liver before cooking had an area greater than 5120  $\mu\text{m}^2$ . We used this threshold to define a specific class appearing after cooking. The lipid droplets larger than 5120  $\mu\text{m}^2$  could be due to the fusion of a smaller one under the effect of heat treatment. The result is the formation of larger droplets having lost their spherical shape. For instance in the livers with low technological yield (high fat loss group), the circularity indexes are from 0.677 to 0.142 before cooking (Table 2) and from 0.527 to 0.109 after cooking (Table 3) for the lowest and the highest droplet area classes, respectively. By observing the relationship between circularity and area of lipid droplets (Fig. 3), it appeared that the larger droplets are, the lesser circular they are. This was true before and after cooking, regardless of the technological yield. Electron microscopy observations (Fig. 1C and D) allow us to draw hypothesis on the origin of this droplet fusion. These findings highlight the “pressure” exerted by the lipid droplets that push various organelles such as nuclei to the periphery of hepatocytes (Fig. 1B). In a study of the influence of the alimentary rhythm and sex on technological yield of goose fatty livers, a deterioration in performance tends to occur at the same time the size of lipid droplets increased, corresponding to a greater “lipid droplets pressure”

(Boullier-Oudot et al., 2008). This phenomenon of “pressure” linked to density is well-known in other cell types. For instance in human preadipocytes (Mc Donough et al., 2009) or in cell adipocyte culture (Gazi et al., 2007) there are clusters consisting of some tens to hundreds of densely packed individual lipid droplets. In these clusters, there are obvious signs of mechanical strain that presses droplets onto each other resulting in distortion of their normal perfect spherical shape (Thiele & Spandl, 2008). In fatty liver before cooking, we can observe some material dense to electron represented by clover leaves into the interior (Fig. 1C and D). It might be some of the excess proteins incorporated into the core of lipid droplets after fusion, according to the results of Ohsaki et al. (2009).

### 3.3. Fat loss during cooking was linked with the fusion of lipid droplets in raw liver

The sums of lipid droplet areas before cooking (76,000  $\pm$  17,000  $\mu\text{m}^2$  and 63,600  $\pm$  2400  $\mu\text{m}^2$  in high and low fat loss group, respectively) and after cooking (67,000  $\pm$  2800  $\mu\text{m}^2$  and 70,800  $\pm$  17,000  $\mu\text{m}^2$  in high and low fat loss group, respectively) were not different according to the technological yield ( $p > 0.05$ ). This result is consistent with the biochemical results (Table 1). This suggests that the significant results linking the characteristics of lipid droplets and the fat loss are not due to a difference in the amount of lipid, but rather to morphological changes.

Table 2 shows at 20 min post mortem, for each class of droplets and in each technological yield group, the number of droplets, their mean grey level and the circularity index. The distributions of number and circularity index differed according to the fat loss. At 20 min post mortem, there were more lipid droplets in cells of fatty liver which later presented a high technological yield ( $p < 0.01$ ). This was especially true for small droplets, with an area less than 320  $\mu\text{m}^2$ : 1771 and 1136 lipid droplets in high and low technological yield groups, respectively. Moreover, in the high technological yield group (that corresponds to low fat loss during cooking) the droplets were more circular ( $p < 0.01$ ). Our results suggest that fat loss during cooking was higher when there was more fusion of lipid droplets before cooking. Indeed, the fact that lipid droplets are larger and less circular in the low technological yield group most likely indicates a



**Fig. 3.** Relationship between circularity index and area of lipid droplets, at 20 min post mortem (represented by square) and after cooking (represented by round), observed in fatty liver with low fat loss.

higher degree of fusion. However, at this stage, it is difficult to know exactly which phenomenon does promote the fusion of lipid droplets in fatty liver before cooking. The reasons why in some cases the cells of raw liver exhibit a large number of small lipid droplets are not known. The implication of microtubules in the fusion of lipid droplets has been demonstrated through the formation of complexes between droplets in the fibroblast cell line NIH 3T3, (Boström et al., 2005). In the same experimental system, Boström et al. (2007) have shown the implication of specific proteins which would mediate droplet fusion. Likewise, the infusion of lipid esters via direct structural continuity between endoplasmic reticulum and lipid droplets is another hypothesis to explain the growth of lipid droplets. In our case, i.e. when the lipid droplets exert such intra-cellular pressure, the morphometric results associated to the link existing between area and circularity index tend to prove the predominant role of fusion in the growth of lipid droplet.

Before cooking, at 20 min *post mortem*, the distribution of grey levels in fatty livers was related to the fat loss. Regardless of the area class, the intensity of staining was therefore less important in the low fat loss group, as indicated by higher grey levels ( $p < 0.01$ ). Variation in electron staining by lead citrate and small variation in section thickness (1.2 times thicker than normal) are unlikely to influence the variation in electron densities (Cheng et al., 2009). It is known that osmium tetroxide preferentially binds to the unsaturated bonds of fatty acids and imparts electron density observable with electron microscopy (Adams et al., 1967; Hayes et al., 1963). Osmium tetroxide does not react with nucleic acids or carbohydrates. It reacts with sulphhydryl and disulphide groups, polyphenols, nitrogen of tertiary bases and therefore to some extent with some proteins. But the predominant reactive group is undoubtedly the fatty acids chains (Wigglesworth, 1957). Cheng et al. (2009) considered that the lipid esters formed by different fatty acids would have different electron densities linked to the number of unsaturated bonds. Their results show that electron density is highest in fibroblasts treated with docosahexaenoic acid (22:6), followed by those treated with linoleic acid (18:2) and oleic acid (18:1). Our results indicate that the fat loss during cooking was higher when the grey level was low and thus the coloration was more intense (suggesting a higher degree of unsaturation). This allows us to hypothesize that a different chemical composition exists inside each lipid droplet and it is linked to the fat loss during cooking, maybe by a predominant propensity to merge. Because we cannot reject the hypothesis of an artifact due to the methodology, further studies are needed to conclude on this point.

After cooking, the distributions of number, grey level and circularity index of lipid droplets classified in six classes of area were not related to the technological yield ( $p > 0.05$ ) (Table 3). It seems that heat treatment induced drastic changes in the morphology of the droplets, thus attenuating the differences observed in raw livers.

Despite the fact that statistical comparison of the counting of the lipid droplets larger than  $5120 \mu\text{m}^2$  within the two groups is not permitted, it can be mentioned that there are 26 and 11 in the high and low fat loss groups respectively. This could indicate that as fusion of fat droplets became more pronounced, fat loss during cooking was greater. The mechanisms underlying the phenomenon of droplets fusion before and during cooking deserve further investigations.

#### 4. Conclusion

The histological method adapted to the study of fatty liver allowed us to acquire new data on lipid droplets, and so to observe the phenomenon of fat loss during cooking from a new angle and to better understand the mechanisms involved in the determinism of the technological yield of duck "foie gras". Our work describes the morphology of lipid droplets from duck fatty livers before and after cooking. We showed that the biological determinism of fat loss during

cooking of duck 'foie gras' can be explained in part by the fusion of droplets in raw livers. Further studies might investigate the heterogeneity observed in the staining intensity of droplets both before and after cooking, in order to determine if they are due to differences in the chemical composition of their lipids and if it can explain the susceptibility to merge.

#### Acknowledgment

Ducks were slaughtered and processed under the facilities of the Lycée Agricole de Périgueux (EPLEPPA, 24, France). The authors are indebted to François Hérault (EPLEPPA) for technical supervision of the slaughter process and to Hélène Manse, Stéphane Seidlinger and Corinne Pautot for technical assistance. The financial supports of INRA, CIFOG and Région Midi-Pyrénées enabled the implementation of this project.

#### References

- Adams, C. W., Abdulla, Y. H., & Bayliss, O. B. (1967). Osmium tetroxide as a histochemical and histological reagent. *Histochemistry*, 9, 68–77.
- Astruc, Th., Gatellier, Ph., Labas, R., Santé-Lhoutellier, V., & Marinova, P. (2010). Microstructural changes in *m. rectus abdominis* muscle after heating. *Meat Science*, 85, 743–751.
- Baudonnet-Lenfant, C., Auvergne, A., & Babilé, R. (1991). Influence de la durée de jeûne avant l'abattage et du poids à la mise en gavage des canards de Barbarie sur la composition chimique hépatique. *Annales de Zootechnie*, 40, 161–170.
- Bénard, G., & Labie, Ch. (1998). Evolution histologique du foie des palmipèdes au cours du gavage. *3<sup>ème</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France, October 27–28* (pp. 31–35).
- Blum, J. C., & Leclercq, B. (1973). Nouvelles précisions sur les modifications biochimiques et histologiques du foie provoquées par le gavage. *Journées Avicoles, Varèse, Italia, May 31–June 4, 2* (pp. 193–207).
- Boström, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frohman, M. A., et al. (2005). Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25, 1945–1951.
- Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B. R., et al. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nature Cell Biology*, 9, 1286–1293.
- Bouillier-Oudot, M., Leprettre, S., Dubois, J. P., & Babilé, R. (2002). Itinéraires post mortem et caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras d'oies. *5<sup>ème</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Pau, France, October 9–10* (pp. 172–175).
- Bouillier-Oudot, M., Leprettre, S., Laurent, N., Dubois, J. P., & Babilé, R. (2006). Caractéristiques histologiques des foies gras d'oies: Relations avec les performances, la composition et la qualité des foies crus et cuits. *7<sup>ème</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Arcachon, France, October 18–19* (pp. 136–139).
- Bouillier-Oudot, M., Dubois, J. P., Auvergne, A., Babilé, R., & Fernandez, X. (2008). Incidence du rythme de gavage et du sexe sur les performances zootechniques d'oies et les caractéristiques chimiques, histologiques et technologiques des foies gras. *8<sup>ème</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Arcachon, France, October 30–31* (pp. 131–134).
- Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y., & Fujimoto, T. (2009). Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochemistry and Cell Biology*, 132, 281–291.
- Delarue, J., & Laumonier, R. (1969). Anatomie pathologique. *Flammarion*, 1, 1037.
- Evans, A. J. (1972). In vivo lipogenesis in the liver and adipose tissues of the female Aylesbury duck at different ages. *British Poultry Science*, 13, 595–602.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., & Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: A classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology*, 130, 263–279.
- Fukumoto, S., & Fujimoto, T. (2002). Deformation of lipid droplets in fixed samples. *Histochemistry and Cell Biology*, 118, 423–428.
- Gazi, E., Gardner, P., Lockyer, N. P., Hart, C. A., Brown, M. D., & Clarke, N. W. (2007). Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *Journal of Lipid Research*, 48, 1846–1856.
- Hayes, T. L., Lindgren, F. T., & Gofman, J. W. (1963). A quantitative determination of the osmium tetroxide-lipoprotein interaction. *The Journal of Cell Biology*, 19, 251–255.
- Journal Officiel de la République Française, 1993, Décret n° 93-9-99 du 09-08-93 du JO du 14-08-93, relatif aux préparations à base de foie gras
- Latil, G., Auvergne, A., & Babilé, R. (1996). Consommation du canard mulard en gavage. Relation avec les performances zootechniques et la qualité du foie gras. *2<sup>ème</sup> Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France, March 12–13* (pp. 93–97).
- Locsmándi, L., Hegedüs, G., Andrásy-Baka, G., Bogenfürst, F., & Romvári, R. (2007). Following the goose liver development by means of cross-sectional digital imaging, liver histology and blood biochemical parameters. *Acta Biologica Hungarica*, 58(1), 35–48.

- Mc Donough, P. M., Agustin, R. M., Ingermanson, R. S., Loy, P. A., Buehrer, B. M., Nicoll, J. B., et al. (2009). Quantification of lipid droplets and associated proteins in cellular models of obesity via content / high throughput microscopy and automated image analysis. *Assay and Drug Development Technologies*, 7(5), 440–460.
- Molee, W., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., & Babilé, R. (2005). Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 141, 437–444.
- Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujita, A., & Fujimoto, T. (2009). Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: From the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, 399–407.
- R development Core Team (2008). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rasband, W. S. (1997–2009). *ImageJ*. Bethesda, Maryland, USA: U.S. National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electro-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 17, 208–212.
- Riesmersma, J. C. (1968). Osmium tetroxide fixation of lipids for electron microscopy A possible reaction mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 152, 718–727.
- Rousselot-Pailley, D., Guy, G., Gourichon, D., Sellier, N., & Blum, J. C. (1992). Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA, Productions Animales*, 5, 167–172.
- Saadoun, A., & Leclercq, B. (1987). In vivo lipogenesis of genetically lean and fat chickens: effects of nutritional state and dietary treatment. *The Journal of Nutrition*, 117, 428–435.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., & Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 44507–44512.
- Thiele, C., & Spandl, J. (2008). Cell biology of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology*, 20, 378–385.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 493–508.
- Wigglesworth, V. B. (1957). The use of osmium in the fixation and staining of tissues. *Proceedings of The Royal Society of London*, 147, 185–199.

## Identification by Proteomic Analysis of Early Post-mortem Markers Involved in the Variability in Fat Loss during Cooking of Mule Duck “Foie Gras”

Laetitia Theron,<sup>†,‡,#</sup> Xavier Fernandez,<sup>†,‡,#</sup> Nathalie Marty-Gasset,<sup>†,‡,#</sup> Carole Pichereaux,<sup>Δ,§</sup> Michel Rossignol,<sup>Δ,§</sup> Christophe Chambon,<sup>⊥</sup> Didier Viala,<sup>⊥</sup> Thierry Astruc,<sup>⊗</sup> and Caroline Molette<sup>\*,†,‡,#</sup>

<sup>†</sup>INRA, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>‡</sup>Université de Toulouse, INPT, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème Métabolisme, ENSAT, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>#</sup>ENVT, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

<sup>Δ</sup>Plateforme Protéomique de la Gépole Toulouse Midi-Pyrénées, IPBS-FR3450, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

<sup>§</sup>IPBS, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31077 Toulouse, France,

<sup>⊥</sup>PFEM, Composante Protéomique, INRA de Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

<sup>⊗</sup>INRA, UR 370 QuaPA, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

**ABSTRACT:** Fat loss during cooking of duck “foie gras” is the main quality issue for both processors and consumers. Despite the efforts of the processing industry to control fat loss, the variability of fatty liver cooking yield remains high and uncontrolled. To better understand the biological basis of this phenomenon, a proteomic study was conducted. To analyze the protein fraction soluble at low ionic strength (LIS), we used bidimensional electrophoresis and mass spectrometry for the identification of spots of interest. To analyze the protein fraction not soluble at low ionic strength (NS), we used the shotgun strategy. The analysis of data acquired from both protein fractions suggested that at the time of slaughter, livers with low fat loss during cooking were still in anabolic processes with regard to energy metabolism and protein synthesis, whereas livers with high fat loss during cooking developed cell protection mechanisms. The variability in the technological yield observed in processing plants could be explained by a different physiological stage of liver steatosis.

**KEYWORDS:** proteomic, bidimensional electrophoresis, mass spectrometry, shotgun, fatty liver, duck, “foie gras” quality, technological yield

### ■ INTRODUCTION

France is the main producer (73%) of “foie gras” (fatty liver) of ducks or geese in the world. French foie gras is a traditional product, a coveted dish with a strong added value. The technological yield is the principal quality trait, and it is evaluated by the loss of fat during cooking. This fat loss constitutes a recurring problem for the industry and consumers because it influences the uniformity of the finished product, in terms of appearance defects (visible fat) and sensory qualities, and the profitability of a sale unit. A maximum value of 30% of fat loss during cooking is imposed by market regulation.<sup>1</sup> There is strong interindividual variability in the processing ability of fatty liver. Under experimental conditions, the coefficient of variation of fat loss is usually around 50%. Under industrial production, a standard practice to reduce the variability of fat loss consists of processing only a part of the livers, chosen on the basis of fresh weight. There is indeed a clear relationship between liver weight and technological yield:<sup>2</sup> the greater the liver weight, the less the technological yield. Despite this, variability in the technological quality is still high.

Until today, the research conducted on the technological yield of foie gras was mainly focused on the influence of production factors<sup>3,4</sup> and technological treatments.<sup>2,5</sup> Studies on the

biochemical determinism of fatty liver quality focused on lipids storage<sup>6,7</sup> and membrane lipids.<sup>8</sup> They failed to link the biochemistry of lipids in raw tissue with the fat loss during cooking of duck foie gras. To our knowledge, the potential role of the protein fraction has never been investigated. We therefore propose to study the expression of proteins early post-mortem to better understand the mechanisms underlying the variability in fat loss during cooking. To have an overview of the implication of proteins in the phenomenon of fat loss, we chose to study separately two protein fractions differing in their solubility and to adapt the separation method for each of these fractions. The soluble fraction at low ionic strength (LIS) was analyzed by two-dimensional electrophoresis, and the spots of interest were identified by mass spectrometry, both MALDI-TOF and LC-MS/MS. The nonsoluble fraction at low ionic strength (NS) was analyzed by a shotgun approach combining a separation by SDS-PAGE and identification of all proteins by mass spectrometry

**Received:** July 18, 2011

**Revised:** October 7, 2011

**Accepted:** October 17, 2011

**Published:** October 17, 2011

with a LC-MS/MS system. The relative quantity of proteins in relation with the technological yield for both fractions was evaluated to highlight differences explaining the phenomenon of fat loss during cooking.

## MATERIAL AND METHODS

**Animals, Breeding, Overfeeding, and Slaughter.** Proteomic analysis was performed on a first set of animals, and validation by Western blot was performed on a second set of animals. All of the animals were bred, overfed, and slaughtered according to the following procedure. Male mule ducks (*Cairina moschata* × *Anas platyrhynchos*) were reared with access to free range until the age of 13 weeks in a poultry house under natural conditions of light and temperature at the Agricultural College of Périgueux (EPLFPA, 24, France) following standard practices.<sup>8</sup> Animals were then overfed in individual cages during 12 days, by the distribution of a soaked-corn mixture (42% grain–58% flour) twice a day. Ducks were slaughtered in the experimental slaughterhouse of the Agricultural College of Périgueux, 10 h after the last meal. The poultry house and the abattoir were located in the same place. Birds were crated in transport modules of four ducks each and transported (5 min) to the slaughter point, by groups of 20 (five crates). The first bird was slaughtered immediately after arrival and the 20th about 40 min later (slaughter rate was one bird every 2 min). Birds were electrically stunned head-only using scissor tongs and bled by ventral cutting of neck vessels. After a 5 min bleeding, the carcasses were scalded and plucked.

The experiments described here fully comply with legislation on research involving animal subjects according to the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Investigators were certified by the French governmental authority for carrying out these experiments (agreement 31-11.43.501).

**Fatty Liver Processing.** At the end of the slaughter process, 20 min after bleeding, livers were removed from the carcass and weighed. Livers were chilled on ice during 6 h and trimmed of their main blood vessels. Each fatty liver was then transversally divided in three parts including the two lobes. In the middle part of each lobe, a slice of approximately 200 g was excised and put into a glass jar. Salt (12 g/kg) and pepper (2 g/kg) were added, and the jars were cooked for 1 h in water in an autoclave ("Brouillon Process", Sainte Bazeille, France) at 85 °C under a pressure of 0.8 bar. Temperature was controlled in the water and in two control jars equipped with temperature sensors. After 30 min of chilling (circulating cool water), the jars were stored at 4 °C for 2 months until the opening for the estimation of the technological yield.

**Technological Yield Estimation.** The jars were opened, and the superficial fat exuded during cooking was carefully removed from the liver. The technological yield was evaluated by the expression of fat loss during cooking as a percentage of initial liver weight:

$$\text{technological yield} = \left( \frac{\text{cooked liver weight trimmed of all visible fat}}{\text{raw liver weight}} \right) \times 100$$

**Biochemical Analysis.** All of these biochemical analyses were performed in duplicate on fatty livers sampled at 6 h post-mortem, after chilling.

**Lipid and Nitrogen Contents.** Total lipids were extracted from the raw fatty livers by homogenization in chloroform–methanol 2:1 (v/v) and measured gravimetrically according to the method of Folch et al.<sup>9</sup> Total nitrogen content of fatty livers was determined using a LECO analyzer (FP 428 model) after total combustion (protein content estimation =  $N \times 6.25$ ).

**Glycogen and Lactic Acid Contents.** These were measured after fatty liver homogenization in 0.5 M perchloric acid. After centrifugation

during 20 min at 2500g, the supernatant was used for both glycogen and lactic acid determination<sup>10</sup> by enzymatic method after glycogen hydrolysis by amyloglucosidase.

**Determination of Protein and Lipid Oxidation.** Protein oxidation was estimated by the detection of carbonyl groups according to the method of Oliver et al.<sup>11</sup> with slight modifications for measurement in meat samples.<sup>12</sup> Carbonyl groups were detected by reactivity with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form protein hydrazones. The results were expressed as nanomoles of DNPH fixed per milligram of protein. Lipid oxidation was measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the method of Lynch and Frey.<sup>13</sup> Samples were incubated with 1% (w/v) 2-thiobarbituric acid in 50 mM NaOH and 2.8% (w/v) trichloroacetic acid in a boiling water bath for 40 min. After cooling in ice, the pink chromogen was extracted with *n*-butanol and its absorbance measured at 535 nm. TBARS concentrations were calculated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as standard. Results were expressed as nanomoles of malonaldehyde (MDA) per milligram of fatty liver.

**Protein Extraction.** The method was adapted from Sayd et al.<sup>14</sup> and was performed on nine fatty livers selected in the group showing low technological yield (<74%) and nine others in the group showing high technological yield (>83%). Ten grams of fatty liver sampled at 20 min post-mortem was frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. The samples were ground in liquid nitrogen to obtain a fine powder. They were then homogenized using a glass bead agitator MM2 (Retsch, Haan, Germany) in a low ionic strength buffer (LIS), 40 mM Tris-HCl (pH 7.4), at 4 °C in a ratio of 1:4 (w/v). The homogenate was centrifuged at 4 °C for 10 min at 10000g. The fat cake was removed, and the homogenization was done a second time. After centrifugation, the supernatant, forming the protein fraction soluble in LIS buffer, was stored at –80 °C. The pellet was washed three times with this buffer to obtain only insoluble proteins in LIS buffer. After the last centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was homogenized in the following buffer: 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (w/v), at 4 °C in the same ratio as the first step. The homogenate was centrifuged at 4 °C for 10 min at 10000g. The supernatant, forming the protein fraction not soluble at low ionic strength, was stored at –80 °C. The protein concentration of both fractions was determined by using Bradford assay (Bio-Rad).

**Analysis of the Protein Fraction Soluble in a Low Ionic Strength Buffer.** *Bidimensional Electrophoresis.* First, 300 µg of proteins of the fraction soluble at low ionic strength was incorporated in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS (w/v), 0.4% carrier ampholyte (v/v), 1% DTT (w/v), and bromophenol blue. Samples were loaded onto immobilized pH gradients strips (pH 5–8, 17 cm, Bio-Rad), and isoelectric focusing was performed using a Protean IEF cell system (Bio-Rad). Gels were passively rehydrated for 16 h. Rapid voltage ramping was subsequently applied to reach a total of 86 kVh. The equilibration buffer contained 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, and 50 mM Tris-Cl, pH 8.8. Strips were first incubated in an equilibration buffer containing 1% DTT. Strips were then incubated in a second equilibration buffer containing 2.5% iodoacetamide and bromophenol blue. After strip equilibration, proteins were resolved on 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a Protean II XL system (Bio-Rad) for the second dimension. Gels were stained with Coomassie Blue (colloidal blue) as previously described by Morzel et al.<sup>15</sup>

*Image Analysis.* All of the gels were analyzed with the software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) to point out spots of interest. Per gel, each detected and matched spot was normalized by expressing its relative intensity to the total intensity of all valid spots. Spots of interest were determined by using the procedure of Meunier et al.,<sup>16</sup> which uses fold change ratio.

**Identification of the Spots of Interest of the Soluble Fraction LIS by Mass Spectrometry.** Coomassie stained spots of

interest were manually excised using pipet tips. The spots were then destained with 100  $\mu\text{L}$  of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  with acetonitrile 95:5 (v/v) for 30 min, followed by two washes in 100  $\mu\text{L}$  of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  with acetonitrile 50:50 (v/v) and then dehydrated in 100% acetonitrile. Gel spots were completely dried using a Speed Vac before trypsin digestion at 37 °C over 5 h with 15  $\mu\text{L}$  of trypsin (10 ng/ $\mu\text{L}$ ; V5111, Promega) in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Peptide extraction was optimized by adding 8  $\mu\text{L}$  of acetonitrile, followed by 10 min of sonication. For matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis, 1  $\mu\text{L}$  of supernatant was loaded directly onto the MALDI target. The matrix solution (5 mg/mL of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid) was immediately added and allowed to dry at room temperature. Peptide Mass Fingerprint (PMF) of trypsin-digested spots was determined in positive-ion reflector mode using a Voyager DE Pro MALDI-TOF-MS (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). External calibration was performed with a standard peptide solution (Peptide Mix 4, Proteomix, LaserBio Laboratories, Sophia-Antipolis, France). PMFs were compared to SwissProt (01/2008, 290 484 seq) protein sequence databases [ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/uniprot/knowledgebase/uniprot\_sprot.fasta.gz] using MASCOT 2.2 software [http://www.matrixscience.com]. The initial search parameters allowed a single trypsin missed cleavage, partial carbamidomethylation of cysteine, partial oxidation of methionine, and mass deviation  $\leq 25$  ppm. The validations are based on the significant score ( $p < 0.05$ ) given by Mascot software, which takes into account the number of matched peptides per protein (at least five peptides) and the decoy score. When identification by MALDI-TOF was unsuccessful, identification was also attempted using nano LC-ion trap MS/MS analysis. Six microliters of peptide mixture was analyzed by online nanoflow liquid chromatography (Ultimate LC (Dionex, Voisins le Bretonneux)). The gradient consisted of 10–90% acetonitrile in 0.5% formic acid at a flow rate of 200 nL/min for 45 min. The eluate was electrosprayed into an LCQDeca through a nanoelectrospray ion source (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Peptide ions were analyzed by the data-dependent “triple play” method: (i) full MS scan ( $m/z$  400–1400), (ii) zoom scan (scan of the major ion with bigger resolution), and (iii) MS/MS of this ion. Identification of peptides was performed with Mascot 2.2, restricting the taxonomy to vertebrates (04/2008, 1177111 sequences) in the protein NCBI database. Mass deviation tolerance was set at 1.5 Da for parent ion and at 0.8 for fragment ions. Protein identification was validated when at least two peptides originating from one protein showed significant identification Mascot scores ( $p < 0.05$ ). Identifications with only two unique peptides were manually validated with criteria of match fragments ions (occurrence of uninterrupted y- or b-ion series of at least three consecutive amino acids, preferred cleavages N-terminal to proline bonds, and mass accuracy).

**Analysis of the Protein Fraction Not Soluble in a Low Ionic Strength Buffer.** *Protein Separation.* Protein preparations from the low fat loss group ( $n = 9$ ) and the high fat loss group ( $n = 9$ ) were reduced with 20 mM DTT and then alkylated in 60 mM chloroacetamide. Samples containing 2% (w/v) SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol, and 62 mM Tris-HCl, pH 6.8, in a ratio 1:1 v/v<sup>17</sup> were heated at 95 °C for 5 min. SDS-PAGE (12% acrylamide) was performed following the method described by Laemmli<sup>17</sup> using a Mini-Protean II electrophoresis unit. Samples were loaded at 50  $\mu\text{g}$  protein per lane. Gels were run at 35 mA/gel (for Mini-Protean II), constant current, until the dye front reached the bottom of the gel. Gels were stained overnight in Coomassie Brilliant Blue G-250 (PageBlue Protein Staining Solution, FERMENTAS).

*Protein Digestion.* Each lane (one for each fat loss group) was systematically cut into 10 bands of similar volume for MS/MS protein identification. Each band was incubated in 25 mM ammonium bicarbonate and 50% ACN until destaining. Gel pieces were dried in a vacuum

SpeedVac (45 °C), further rehydrated with 30  $\mu\text{L}$  of a trypsin solution (10 ng/L in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), and finally incubated overnight at 37 °C. The resulting peptides were extracted from the gel as described previously.<sup>18</sup> The trypsin digests were dried in a vacuum SpeedVac and stored at  $-20$  °C before LC-MS/MS analysis.

*Nano-LC-MS/MS Analysis.* The trypsin digests were separated and analyzed by nano-LC-MS/MS using an Ultimate 3000 system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The peptide mixture was loaded on a C18 precolumn (300  $\mu\text{m}$  inner diameter, 15 cm PepMap C18, Dionex) equilibrated in 95% solvent A (5% acetonitrile and 0.2% formic acid) and 5% solvent B (80% acetonitrile and 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 5–50% gradient of solvent B during 80 min at 300 nL/min flow rate. The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with the Xcalibur software (version 2.0.6, Thermo Fisher Scientific). Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap over the  $m/z$  300–2000 range with the resolution set to a value of 60000. The five most intense ions per survey scan were selected for collision-induced dissociation (CID) fragmentation, and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ). Dynamic exclusion was used within 60 s to prevent repetitive selection of the same peptide. To automatically extract peak lists from Xcalibur raw files, the ExtractMSN macro provided with Xcalibur was used through the Mascot Daemon interface (version 2.3.2, Matrix Science, London, U.K.). The following parameters were set for creation of the peak lists: parent ions in the mass range 400–4500, no grouping of MS/MS scans, and threshold at 1000. A peak list was created for each fraction analyzed (i.e., gel slice), and individual Mascot searches were performed for each fraction.

*Database Search.* MS/MS spectra were processed by Mascot software against the *Gallus gallus* (SwissProt-TrEmbl) and *Cairina moschata*–*Anas platyrhynchos* (NCBI) databases. The following search parameters were applied: trypsin as cleaving enzyme, “ESI-Trap” as instrument, peptide mass tolerance of 10 ppm, MS/MS tolerance of 0.8 Da, and one missed cleavage allowed. Methionine oxidation was chosen as variable modification.

**Bioinformatic Analysis.** *Validation and Semiquantitation.* The MFPaQ software<sup>19</sup> was used to validate the results (1.3% FDR) and to analyze the data. This software is a Web application that allows fast and user-friendly verification of Mascot result files as well as data quantification. In particular, the spectral counts corresponding to each identified protein were extracted from each analysis.<sup>20,21</sup> Taking into account the molecular weight of proteins, we define an abundance index (PAI): PAI = spectral counts/molecular weight  $\times$  2500. This index allows us to classify in a semiquantitative way the proteins inside each sample.

*Functional Analysis.* The proteins validated by the software MFPaQ were introduced in the Protein Center software (Proxeon, Odense, Denmark; http://www.proteincenter.proxeon.com), where they were clustered with a criterion of 60% homology. Analysis of the functional distribution of groups is then done, taking into account the classification established by “Genome Ontology”.

*Western Blot of Mitochondrial Carrier Protein Homologue (MIMP).* The NS fraction was used to perform Western blots of MIMP using samples from the second experiments (independent samples). Following SDS-PAGE, gel was steeped in transfer buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% v/v methanol<sup>22</sup> during 10 min. The proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham) at 100 V during 30 min using a transfer cell (Criterion Blotter, Bio-Rad). Membrane was blocked with milk buffer containing 3% w/v milk powder in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.5) at room temperature for 1 h. Following blocking, membrane was probed for specific proteins using primary antibody (goat anti-MIMP, sc-79980 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) overnight at 4 °C. The primary antibody to milk buffer ratio was 1:500. Then, the membrane was washed

**Table 1. Technological Yield and Biochemical Characteristics of the Fatty Livers<sup>a</sup>**

	low fat loss	high fat loss	significance
fatty liver weight, g	570 ± 44	566 ± 42	NS
technological yield, %	88.8 ± 4.3	68.2 ± 6.1	<i>p</i> < 0.001
lipid content, %	57.6 ± 2.0	58.6 ± 1.8	NS
protein content, %	7.6 ± 0.8	7.0 ± 0.5	NS

<sup>a</sup> For each fat loss group (*n* = 9), results are reported as the mean value ± standard deviation. NS, nonsignificant.

three times with PBS buffer and incubated in secondary antibody (rabbit anti-goat IgG-HRPsc-2768, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) at room temperature for 1 h. The secondary antibody to milk buffer ratio was 1:10000. Following this incubation, the membrane was washed three times with PBS buffer, and the chemiluminescent substrate (Super Signal West Pico, Thermo-Pierce) was then used to detect the reactivity of the primary antibody with its antigen. Photographs of the Western blot were taken by making a contact between the membrane and a photo film (Amersham HyperfilmMP, GE Healthcare). The film was then developed by steeping in 20% revelation solution (AL4, Kodak), distilled water, and 20% fixation solution (LX24, Kodak) for 1 min each, respectively. The pool of samples was used as a reference. Band intensity of samples was then measured by using Image Analysis (ImageMaster 2D Platinum 6.0, GE Healthcare). It was expressed as a percentage of reference protein.

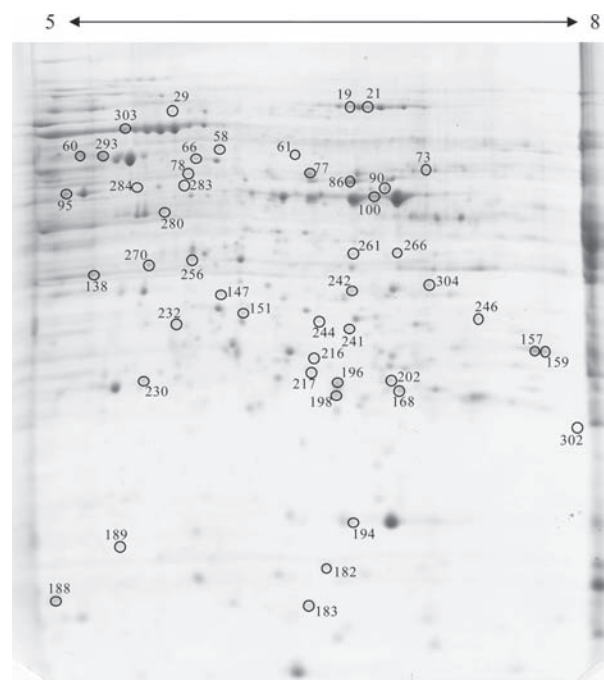
**Statistical Analysis.** To determine the significance of fat loss during cooking, a *t* test was used to analyze biochemical data and MIMP protein band intensities. Results are expressed as the mean ± standard deviation.

## RESULTS AND DISCUSSION

The aim of this proteomic study was to identify differential protein expression early post-mortem according to fat loss during cooking of duck fatty livers. The liver weight, as well as the lipid and protein contents, is known to affect the technological yield.<sup>2</sup> That is why the comparison was conducted on two groups showing significant differences only for the yield (*p* < 0.001) but similar liver weight and lipid and protein contents (Table 1).

**Low Ionic Strength Protein Fraction.** The image analysis performed on 2D gels allowed the matching of 187 spots. By comparing the proteomic maps at 20 min post-mortem of high and low fat loss groups, the statistical analysis revealed 47 spots of interest (Figure 1). Early post-mortem, 8 and 4 spots were overexpressed in the high and low fat loss groups, respectively; 1 was detected only in the high fat loss group, and 34 were detected only in the low fat loss group. The use of both MALDI-TOF-MS and LC-MS/MS allowed the identification of 13 proteins (Table 2). The sequences were identified by comparison with *G. gallus* and *A. platyrhynchos* databases. The 13 proteins identified could be classified according to their biological functions: four were involved in metabolism, four in cellular oxidative stress, and one in calcium homeostasis; one had a proteolytic activity, one took part in ATP synthesis, and two were miscellaneous proteins.

**Metabolism.** Among the 13 proteins identified in the LIS protein fraction, 4 are involved in energy metabolism. Triosephosphate isomerase 1 (spot 302),  $\alpha$ -enolase (spot 100), and malate dehydrogenase (spot 138) were detected only in the low fat loss group, whereas fatty acid binding protein 4 (FABP4) (spot 304) was detected only in the high fat loss group. Triosephosphate isomerase 1 and  $\alpha$ -enolase are glycolytic enzymes, responsible



**Figure 1.** Representative two-dimensional gel electrophoresis map of duck fatty liver. The first dimension was performed between pH 5 and 8. The second-dimension gel contains 12% acrylamide. Three hundred micrograms of proteins was loaded. The black circles indicate the differentially expressed proteins.

for the fifth and ninth steps of glycolysis, respectively. Malate dehydrogenase is an enzyme of the citric acid cycle that catalyzes the reversible conversion of malate into oxaloacetate, using  $\text{NAD}^+$ . This enzyme is also involved in gluconeogenesis. Fatty acid binding protein 4 is involved in carbohydrate biosynthesis. We measured the glucose and lactic acid contents in both groups of fat loss during cooking. We found a higher quantity of glycogen in livers that will have a low fat loss during cooking and an equal quantity of lactic acid in both groups (Figure 2). We hypothesized that in these livers, the glycolytic metabolism was still efficient because they have enough energetic resources. At the end of the overfeeding process, lipid metabolism is enhanced in geese livers as shown by gene expression profile<sup>23</sup> and in duck livers as found by proteomic analysis,<sup>24</sup> whereas overfeeding has a down-regulative effect on genes involved in glycolysis in geese livers.<sup>23</sup> In our study, the livers were sampled at the end of the process of overfeeding. Our results revealed that in the low fat loss group, there was an overexpression of proteins involved in metabolism. These livers may still be in a dynamic process of lipid synthesis and storage. Furthermore, the expression of the *FABP4* gene is related to human liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease.<sup>25</sup> We built experimental groups with equivalent lipid content so we cannot correlate the expression of proteins with this parameter, but because of this relationship in human disease, we can speculate that the overexpression of *FABP4* in the high fat loss group might be a marker of a protective reaction of the liver. This result leads us to draw the hypothesis that the livers which will show a high fat loss during cooking have developed before slaughter cell protection mechanisms.

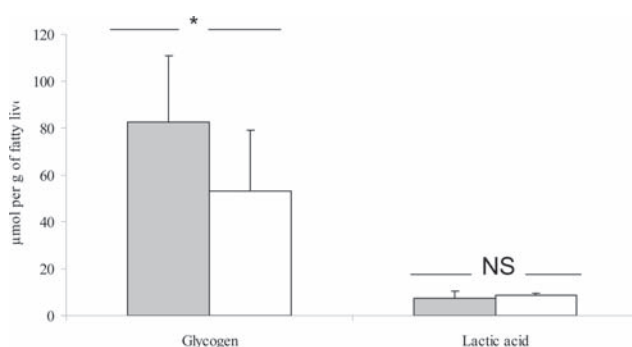
**Cellular Oxidative Stress.** Four spots identified in the LIS protein fraction were related to oxidoreduction process: one was

Table 2. Identification of Spots from LIS Protein Fraction for Which Expression Early Post-mortem Was Linked to Fat Loss during Cooking

sequence ref <sup>f</sup>	spot no.	low fat loss	high fat loss	protein name; <sup>g</sup> taxonomy	score Mascot <sup>b</sup>	sequence coverage; <sup>c</sup> %	no. of peptides matched <sup>d</sup>	theor MW; <sup>e</sup> kDa	theor pI <sup>f</sup>
FTNGVNY03F0Z2X.s.ap.2	302	1.15 ± 0.53	ND	triosephosphate isomerase; <i>Anas platyrhynchos</i>	108	37	14	43668	8.77
M20749.s.ap.2	100	0.20 ± 0.21	ND	$\alpha$ enolase 1; <i>Anas platyrhynchos</i>	110	36	17	61834	8.42
FTNGVNY03F0BE0.s.ap.2	138	0.52 ± 0.55	ND	malate dehydrogenase cytoplasmic-like; <i>Anas platyrhynchos</i>	75	15	8	58602	8.85
DQ358123.s.ap.2	304	ND	0.56 ± 0.59	fatty acid binding protein 4; <i>Anas platyrhynchos</i>	120	44	15	23747	8.50
<b>Oxidoreduction Process</b>									
gill18093103	196 <sup>f</sup>	0.56 ± 0.32	0.34 ± 0.19	Prdx3 protein; <i>Gallus gallus</i>	155	8	2	30972	8.40
gill18093103	168 <sup>f</sup>	0.10 ± 0.03	0.28 ± 0.10	Prdx3 protein; <i>Gallus gallus</i>	77	8	2	30972	8.40
F3 T72ZM05F2QQ6.s.ap.0.2	194 <sup>f</sup>	0.12 ± 0.03	0.66 ± 0.27	superoxide dismutase 1; <i>Anas platyrhynchos</i>	68	32	6	32279	8.52
gill224071287	86 <sup>f</sup>	0.34 ± 0.06	1.58 ± 0.75	aldehyde dehydrogenase 2; <i>Taeniopygia guttata</i>	181	11	5	56746	6.68
<b>Cellular Calcium Ion Homeostasis</b>									
FTNGVNY03GIRIX.s.ap.2	256	0.14 ± 0.20	ND	regucalcin; <i>Anas platyrhynchos</i>	93	34	13	43725	8.18
<b>Proteolytic Activity</b>									
gill259835	188 <sup>f</sup>	0.26 ± 0.25	ND	preprocathepsin D; <i>Gallus gallus</i>	112	8	2	43270	5.90
<b>ATP Synthesis</b>									
FTNGVN Y03F3RUW.s.ap.0.2	95	0.31 ± 0.18	ND	ATP synthase subunit $\beta$ ; <i>Anas platyrhynchos</i>	143	47	21	54441	5.11
<b>Miscellaneous</b>									
gill7658009	182	0.32 ± 0.34	0.21 ± 0.12	protein kinase C inhibitor; <i>Anas platyrhynchos</i>	70	60	6	13697	6.04
GIDS3QQ02DOEUG.s.ap.2	242	0.12 ± 0.04	0.44 ± 0.39	agmatinase; <i>Anas platyrhynchos</i>	77	20	9	42733	8.65

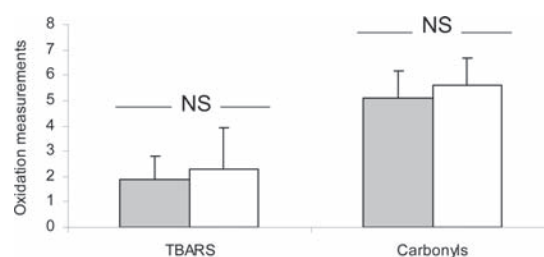
<sup>a</sup> Protein name and sequence reference were derived from Swiss-Prot database and EST database. <sup>b</sup> The Mascot baseline significant score is 67. <sup>c</sup> Percent of coverage of the entire amino acid sequence. <sup>d</sup> Number of matched peptides in the database search. <sup>e</sup> Molecular weight (MW) and pI theoretical (recorded in UniProtKB/Swiss-Prot databases for MALDI-TOF and NCBI database vertebrates taxonomy for LC-MS/MS). <sup>f</sup> Preprocathepsin D (spot 188); Prdx3 protein (spots 168 and 196), superoxide dismutase 1 (spot 194), and aldehyde dehydrogenase 2 (spot 86) were identified by LC-MS/MS.





**Figure 2.** Glycogen and lactic acid measurements in duck fatty livers showing low (gray) and high (white) fat loss during cooking. For each fat loss group ( $n = 9$ ), results are reported as the mean value  $\pm$  standard deviation and are expressed as micromoles per gram of raw fatty liver. NS, nonsignificant; \*,  $p < 0.05$ .

overexpressed in the low fat loss group, that is, the peroxiredoxin protein III (Prdx3; spot 196), and three were overexpressed in the high fat loss group, that is, Prdx3 protein (spot 168), superoxide dismutase 1 (SOD-1; spot 194), and aldehyde dehydrogenase 2 (spot 86). SOD-1 is a peroxisomal free radical scavenging enzyme that dismutates reactive oxygen species to hydrogen peroxide and molecular oxygen. Removal of superoxide radicals by SOD prevents formation of very active hydroxyl radicals. Prdx3 and aldehyde dehydrogenase 2 are involved in redox regulation of the cell. To validate the physiological significance of the identified proteins, we determined the oxidation states of proteins and lipids. For this purpose, we compared the amount of carbonyl groups and TBARS between low and high fat loss group. The results did not show significant differences (Figure 3). We assume that the lack of specificity and sensitivity of the method<sup>26</sup> and the individual variability found in the biochemical analysis do not allow us to link oxidative stress to fat loss mechanisms. In a proteomic analysis of mice livers by iTRAQ, Iff et al.<sup>27</sup> showed that SOD-1 was up-regulated in the livers of STAT6 (signal transducer and activator of transcription) knockout mice. In STAT6-null mice, liver lipid content was significantly increased when compared to the wild type controls. Cu/Zn SOD gene expression was diminished in subjects with cirrhosis secondary to NASH when compared with healthy controls.<sup>28</sup> During overfeeding of mule ducks, the expression of antioxidant proteins is increased.<sup>24</sup> From this, the expression of SOD at the level of the gene or the protein is still contradictory. Nevertheless, because reactive oxygen species accumulation leads to oxidative stress, the latter being enhanced with lipid accumulation, the livers may have developed a protective system due to the steatosis stage. Both fat loss groups present antioxidant proteins, but in the case of livers that will have a high fat loss during cooking, they might have more intense oxidative stress because of a more advanced stage of steatosis. We calculated the correlations between the technological yield and spots intensities. The Prdx3 protein (spot 168) intensity showed a correlation of  $-0.67$  ( $p = 0.03$ ), the SOD-1 (spot 194) intensity showed a correlation of  $-0.62$  ( $p = 0.07$ ), and the aldehyde dehydrogenase 2 (spot 86) intensity showed a correlation of  $-0.59$  ( $p = 0.07$ ). The intensities of the three spots overexpressed in the high fat loss group are negatively correlated with the technological yield, emphasizing our hypothesis of increased oxidative stress in high fat loss livers. These results indicate that the more these proteins



**Figure 3.** Lipid and protein oxidation evaluation by detection of TBARS species and carbonyl groups, respectively, in duck fatty livers showing low (gray) and high (white) fat loss during cooking. TBARS species are expressed as nanomoles of malondialdehyde per milligram of fatty liver, and carbonyl groups are expressed as nanomoles of DNPH per milligram of proteins. For each fat loss group ( $n = 9$ ), results are reported as the mean value  $\pm$  standard deviation. NS, nonsignificant.

were expressed, the less the technological yield was and so the higher the fat loss during cooking of fatty livers.

**Calcium Homeostasis.** In the LIS protein fraction, one protein was found to be a part of cellular calcium homeostasis: regucalcin (spot 256), which is detected only in low fat loss group. Regucalcin is a calcium-binding protein that plays a multifunctional role in liver cells.<sup>29</sup> Because regucalcin can be involved in many processes in liver cells, it is difficult to comment on its up-regulation in the low fat loss group. Nevertheless, the expression of hepatic regucalcin mRNA is enhanced in regenerating rat liver after hepatectomy.<sup>30</sup> Furthermore, in a proteomic analysis of mice livers by iTRAQ, Iff et al.<sup>27</sup> showed that regucalcin was up-regulated in the livers of STAT6 knockout mice. The livers that will have a low fat loss during cooking may be still in development and in adaptation process to lipid synthesis due to the high amount of dietary glucose intake. This is consistent with the increase of regucalcin expression at the end of the overfeeding in mule ducks, already reported in the proteomic study.<sup>24</sup>

**Proteolytic Activity.** Preprocathepsin D (spot 188) is detected only in low fat loss group. Preprocathepsin D is the inactive form of cathepsin D, which is a lysosomal aspartic protease. Cathepsin D is a major lysosomal enzyme involved in protein degradation. To our knowledge, few studies are available on the role of cathepsin D in steatosis. Cathepsin D appears to act as part of the effector protease cascade in hepatocyte apoptosis.<sup>31</sup> The expression of preprocathepsin D in the low fat loss group does not mean necessarily a more intense proteolysis or an enhanced apoptotic pathway. Further studies are needed to conclude on this point.

**ATP Synthesis.** Spot 95 was identified as the ATP synthase subunit  $\beta$ , detected only in the low fat loss group. The expression of this protein in only the low fat loss group may reflect a higher energy production in the livers constituting this group. This protein could be a good marker of the phenomenon studied here because this spot was not detected in the proteomic analysis of livers with a low technological yield.

**Miscellaneous.** The protein kinase C inhibitor (spot 182) was overexpressed in the low fat loss group. Because of the large spectrum of activities of this protein, we cannot reach a clear hypothesis on its contribution to the variability in liver quality. The agmatinase (spot 242) was overexpressed in the high fat loss group. Agmatinase hydrolyzes agmatine to putrescine and urea. Agmatinase was found to be up-regulated in a proteomic analysis of mouse livers with nonalcoholic fatty liver induced by a high-fat

Table 3. Identification of Proteins Detected Only in the Low Fat Loss Group in the NS Protein Fraction<sup>a</sup>

sequence ref	protein name; taxonomy	CC	BP	MF	sequence coverage	peptide count	PAI
Q98TH5	ribosomal protein S11; <i>Gallus gallus</i>	Ri	MP	Str	28.5	5	44.3
Q5ZK18	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	10.3	3	42.7
Q6ITC7	40S ribosomal protein S13; <i>Gallus gallus</i>	Ri	MP	Str	33.1	3	39.7
Q5F412	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Csk	CO	PB	25.8	2	33.7
Q6EE61	ribosomal protein L17 (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Ri	MP	Str	27.4	4	31.8
Q5ZJ12	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy			18.7	6	31.7
P08636	40S ribosomal protein S17; <i>Gallus gallus</i>	Ri	MP	Str	45.9	3	29.6
Q08200	60S ribosomal protein L10 (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Ri	MP	Str	22.4	5	28.6
Q9PVL6	mitochondrial carrier homologue 2; <i>Gallus gallus</i>	Mb	T		23.1	4	23.4
Q5ZLE6	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H; <i>Gallus gallus</i>	Cy	CO	TA	19.8	3	23.0
Q3YI09	5'-AMP-activated protein kinase $\gamma$ -1 noncatalytic subunit variant 2; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	23.2	6	21.7
Q5ZLA5	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E; <i>Gallus gallus</i>	Cy	CO	TA	13.3	5	20.2
Q5ZK70	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	6.5	2	16.2
Q5F3N1	protein-;isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	22.4	3	13.2
Q5ZIV0	serine/threonine-protein phosphatase; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	9.8	3	13.1
Q5ZLL5	ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5, mitochondrial; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	15.8	3	12.9
013268	proteasome subunit $\alpha$ type-7; <i>Gallus gallus</i>	Pr	MP	CA	13.7	2	12.0
Q9I8D4	fructose-1,6-bisphosphatase (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	7.7	2	11.9
Q5ZJZ5	D- $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	12.7	1	11.8
B3TZB3	CGI-58; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	14.3	4	11.7
Q5ZIP1	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	11.6	1	11.6
Q95HB3	MHC class I antigen $\alpha$ chain; <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	RS			9	11.3
Q156C7	5'-AMP-activated protein kinase $\beta$ -2 noncatalytic subunit transcript variant 2; <i>Gallus gallus</i>			CA	15	2	10.9
Q5ZLQ7	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	CO		12.3	4	10.7
A9CP13	D-serine dehydratase (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Mb			13.6	3	10.6
Q5ZIV8	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CDi	PB	14.7	2	10.0
Q5ZIG4	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	14.6	1	10.0
Q5ZJ93	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	11.4	2	9.3
Q5ZHT1	acyl-CoA dehydrogenase family member 11; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	8.5	5	9.0
Q5ZKX8	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	TA	9.1	2	8.6
Q5ZLP8	insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3; <i>Gallus gallus</i>	Cy	RBP	TA	9.1	2	8.6
B6V3H7	CAPN1; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	7.9	5	8.5
Q0KKP4	lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	8.1	3	8.5
Q2LAI0	5'-AMP-activated protein kinase $\alpha$ -2 catalytic subunit; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	7.4	1	7.2
Q2PUH1	5'-AMP-activated protein kinase $\alpha$ -1 catalytic subunit; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	8.9	3	7.1
P13216	adrenodoxin, mitochondrial (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	6.3	1	7.0
B2M0K4	ADP-dependent glucokinase; <i>Cairina mosckata</i>	Mb	MP	CA		1	6.8
Q5ZLS9	ubiquitin carrier protein; <i>Gallus gallus</i>		RBP	CA	7.5	1	6.8
Q5F353	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Go	T	PB	7.3	1	6.8
Q90997	transferrin receptor protein 1; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CO	CA	6.1	2	6.4
P20678	cytochrome P450 2H2; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	4.1	1	6.1
Q8UUX5	GDP/GTP exchange factor VAV2; <i>Gallus gallus</i>	Mb	RBP	MB	5.1	3	6.0
Q5ZL25	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	CO	TA	8.8	2	5.7
Q5ZHM0	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	5.6	2	5.6
Q5ZL61	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Mb	T	NB	8	2	5.5
Q5ZK08	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	5.9	2	5.4
	Ig Y heavy chain (7.8S); <i>Anas platyrhynchos</i>					3	5.2
Q5ZLB8	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CO	CA	5.7	1	5.2
Q5ZLD4	transmembrane protein 11; <i>Gallus gallus</i>	Mb		PB	8.2	1	5.2
Q5F4B5	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	4.5	1	4.7
Q805C1	glycogen synthase (fragment); <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	3.8	1	4.2
042133	$\mu$ -calpain large subunit; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	3.4	1	4.2

Table 3. Continued

sequence ref	protein name; taxonomy	CC	BP	MF	sequence coverage	peptide count	PAI
QSZMR2	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	1.9	1	4.2
QSF430	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		MP	TA	4.3	1	4.1
QSZHQ6	acyl-CoA-binding domain-containing protein 5; <i>Gallus gallus</i>	Mb	T		6.3	2	4.1
QSZMU8	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Go	CO	PB	3.4	1	3.9
Q1HFX8	MHC class II antigen $\beta$ chain; <i>Cairina mosckata</i>	Mb	RS			1	3.9
QSZJV9	CCR4-N0T transcription complex subunit 7; <i>Gallus gallus</i>	Nu	RBP	TA	3.5	1	3.5
042094	$\alpha$ 1 integrin; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CM	Sig	3.8	2	3.4
QSZHL0	V-type proton ATPase subunit d 2; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	4.3	1	2.8
QSZMS0	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Nu	CO	NB	2.2	2	2.8
Q90748	brush border myosin IB; <i>Gallus gallus</i>	Csk	CO	NB	2.8	2	2.7
P18652	ribosomal protein S6 kinase 2 $\alpha$ ; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	33	2	2.7
P98157	isoform 1 of low-density lipoprotein receptor-related protein 1; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CO	MB	1.4	2	2.6
QSF319	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	2.7	1	2.6
QSZK65	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Go	T	PB	2.8	1	2.3
QSZIJ9	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2; <i>Gallus gallus</i>	Cy	RBP	CA	2.2	1	2.1
QSF3Q3	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		RBP	CA	2.2	1	1.9
Q9PW08	aminopeptidase (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	2.1	1	1.8
OSZJT0	ATP-dependent RNA helicase SUPV3L1, mitochondrial; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	1.5	1	1.3

<sup>a</sup>The main cellular component (CC), biological process (BP), and molecular function (MF) are presented for each protein. The peptide count corresponds to peptide with a FDR < 1.3%. The protein abundance index (PAI) is calculated as indicated under Materials and Methods. Abbreviations: (cellular component) Cy, cytoplasm; Csk, cytoskeleton; EC, extracellular; Go, Golgi apparatus; Mb, membrane; Nu, nucleus; Pr, proteasome; Ri, ribosome; Sp, spliceosome; (biological process) CC, cell communication; CDi, cell differentiation; CM, cell motility; CO, cell organization; COa, coagulation; DR, defense response; MP, metabolic process; RBP, regulation of biological process; RS, response to stimulus; T, transport; (molecular function) CA, catalytic activity; E, enzyme regulator activity; MB, metal ion binding; NB, nucleotide binding; PB, protein binding; Sig, signal transducer activity; Str, structural molecule activity; T, transporter activity; TA, translation regulator activity.

diet.<sup>32</sup> In the same study, histological observations showed that these mice developed macrovesicular steatosis without necrosis, inflammation, or fibrosis. It seems that even if our previous results showed that the livers from the high fat loss group were in a more advanced stage of steatosis, they are not in a pathological state.

**Nonsoluble at Low Ionic Strength Protein Fraction.** The shotgun method applied to the NS protein fraction resulted in the detection and identification of 784 proteins in both groups of fat loss during cooking. They were grouped in 615 clusters with 60% sequence homology by using the software ProteinCenter (Proxeon, Odense, Denmark; <http://www.proteincenter.proxeon.com>). The comparison of clusters of proteins showed that 70 groups were detected only in low fat loss sample (Table 3) and 71 in high fat loss sample (Table 4). An abundance index (PAI, Protein Abundance Index) was determined from the spectral counts. It was used to evaluate the relative amounts of proteins in the specific groups of the two groups. In both tables, for each protein, the main cellular component, biological process, and molecular function are presented. In both groups of fatty livers, the proteins were mainly from cytoplasm and membrane (Figure 4).

In the high fat loss group, the comparison of the proteins with the GO database did not show the predominance of a cellular component, biological process, or molecular function but two groups of proteins each containing just one protein having a strong value of PAI. We thought it interesting to study more especially these proteins because of their overexpression within the sample of high fat loss. These proteins were identified as heat shock protein 27 (HSP 27) and  $\alpha$  isoform of calponin-1. The protein HSP 27 contributes to the stabilization of intracellular

actin filaments and could play a regulatory role in the organization of the cytoskeleton. An overexpression of HSP 27 in plasma was found in human patients with liver disease, associated with oxidative stress.<sup>33</sup> Calponin is an actin binding protein and is implicated in the regulation and modulation of smooth muscle contraction. A proteomic analysis of human liver revealed that calponin reflects a contribution of activated stellate cells to chronic liver injury.<sup>34</sup> Calponin is one of the markers expressed by differentiated hepatic stellate cells.<sup>35</sup> Hepatic stellate cells play a main role in excessive production and accumulation of extracellular matrix in liver fibrosis. The overexpressions of these two proteins may traduce a mechanism of defense of the tissue and a protective effect of the integrity of the cells. This can be consistent with the previous results found in the analysis of the protein fraction soluble at low ionic strength: the fatty livers that will have a high fat loss during cooking seem not to be in a synthesis process anymore but rather in protective mechanisms against lipid accumulation.

In the low fat loss group, the comparison of the groups of proteins with the GO database revealed that 13 groups of proteins over-represented were mainly from the ribosome ( $p = 5.3 \times 10^{-5}$ ), involved in translation process ( $p = 2.3 \times 10^{-3}$ ), and corresponded to the function of structural constituent of ribosome ( $p = 5.2 \times 10^{-5}$ ) (Table 5). Ribosomal proteins are up-regulated during overfeeding of geese.<sup>23</sup> Moreover, translation factors were found to be overexpressed during overfeeding of ducks<sup>24</sup> and geese.<sup>23</sup> This is consistent with the increase in the protein quantity during the beginning of the period of fat accumulation in livers.<sup>36,37</sup> The overexpression of ribosomal proteins at 20 min post-mortem within the group of low fat loss during cooking could be consistent with the hypothesis of

Table 4. Identification of Proteins Detected Only in the High Fat Loss Group in the NS Protein Fraction<sup>a</sup>

sequence ref	protein name; taxonomy	CC	BP	MF	sequence coverage	peptide count	PAI
Q00649	heat shock protein 27; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CDi	PB	37.8	6	46.6
P26932	isoform $\alpha$ of calponin-1; <i>Gallus gallus</i>		CO	PB	26.7	7	44.5
QSZMV5	actin-related protein 2/3 complex subunit 5; <i>Gallus gallus</i>	Csk	RBP	PB	37.7	4	33.1
D0VX27	mitochondrial ubiquinol-cytochrome <i>c</i> reductase 7.2 kDa protein; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	27.9	1	32.8
057535	nucleoside diphosphate kinase; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CDi	CA	39.2	4	32.7
QSZL50	profilin; <i>Gallus gallus</i>	Csk	CO	PB	42.9	4	28.6
C7EC61	ferrochelatase; <i>Anas platyrhynchos</i>	Cy	MP	CA		4	28.2
QSF425	protein lin-7 homologue C; <i>Gallus gallus</i>	Mb	RBP	PB	21.8	3	25.4
QSZLJ0	putative uncharacterized protein (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Cy	CDi	CA	38.8	4	24.2
P84175	40S ribosomal protein S12; <i>Gallus gallus</i>	Ri	RBP	Str	13.6	2	22.7
Q25QX5	BASH/BLNK N-terminal associated protein 1; <i>Gallus gallus</i>	Mb			16.9	4	21.1
Q01841	protein-glutamine $\gamma$ -glutamyltransferase 2; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	12	8	20.3
QSZL12	proteasome subunit $\alpha$ type; <i>Gallus gallus</i>	Pr	MP	CA	15.7	5	19.6
Q800K9	surfeit locus protein 4; <i>Gallus gallus</i>	Mb		PB	19.7	4	18.6
Q6EE30	eukaryotic translation elongation factor 1; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	TA	8	5	18.3
P50655	ATP synthase protein 8; <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	MP	CA		1	18.2
QSZLG6	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		Coa	MB	8.4	2	17.3
B2M0J6	Mn superoxide dismutase; <i>Cairina moschata</i>		MP	CA		2	16.9
Q66VY4	splicing factor 3a subunit 2; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CC	Str	17.5	3	15.9
Q9DF58	integrin-linked kinase; <i>Gallus gallus</i>	Mb	RBP	CA	10.8	3	15.5
Q05423	fatty acid-binding protein, brain; <i>Gallus gallus</i>	Cy	T	T	14.4	2	15.2
QSZKX9	ER lumen protein retaining receptor 2; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CO	Sig	10.4	2	14.2
QSF387	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Sp		MB	11	2	14.0
A7WPN2	putative uncharacterized protein LOC769360; <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	T			1	13.3
042479	ferrochelatase, mitochondrial; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	10.7	1	12.4
QSZHWS	proteasome subunit $\alpha$ type; <i>Gallus gallus</i>	Pr	MP	CA	24.7	1	11.8
QSZKPS	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	10.1	4	11.2
QSZI78	tumor necrosis factor $\alpha$ -induced protein 8; <i>Gallus gallus</i>	Cy	CDi	PB	10.6	1	10.6
QSZML5	protein LSM12 homologue; <i>Gallus gallus</i>			PB	11.3	2	10.3
A6ZJ09	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5; <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	MP	CA		3	9.9
Q90WR6	sulfotransferase 1C; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	9.1	1	9.8
QSZJ49	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	6.7	1	9.6
QSZIR0	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Mb			24.3	1	9.3
B5AG23	complement component 3d; <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb		E		1	9.1
Q90ZK7	putative FK506-binding protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	9.3	1	8.8
P51890	lumican; <i>Gallus gallus</i>	EC		CA	7.9	2	8.7
QSZLY3	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy		PB	9.4	3	8.5
Q07718	ES/130 (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Mb	T	Str	9.1	3	8.3
QSZI29	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	7.8	2	8.1
QSZLV0	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Mb	T	PB	8.5	1	8.1
QSZJY1	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	4.8	1	8.0
P05122	creatine kinase B-type; <i>Gallus gallus</i>	Cy		CA	7.1	1	7.9
QSZKH1	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CO	Str	6.9	1	7.7
A6ZJ08	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4; <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	MP	CA		2	6.5
QSZMD2	ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 2; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	5.2	2	6.5
QSZI14	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	7.6	1	6.1
Q6EE60	ribosomal protein L18 (fragment); <i>Gallus gallus</i>	Ri	MP	Str	7.8	1	6.0
A6ZJ01	cytochrome <i>c</i> oxidase subunit 1; <i>Anas platyrhynchos</i>	Mb	MP	CA		2	5.8
Q90952	serum paraoxonase/arylesterase 2; <i>Gallus gallus</i>	Mb	MP	CA	2.5	1	5.6
QSZLW1	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	5.2	2	5.6
P08642	GTPase HRas; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CDi	CA	13.2	1	5.3
Q34160	cytochrome <i>b</i> ; <i>Cairina moschata</i>	Mb	MP	CA		2	5.3
Q98UJ7	branched-chain $\alpha$ -keto acid dehydrogenase E1- $\beta$ subunit; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	4.3	1	5.1
QSZKP8	lysyl-tRNA synthetase; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	4.2	1	5.1

Table 4. Continued

sequence ref	protein name; taxonomy	CC	BP	MF	sequence coverage	peptide count	PAI
QSZK09	uncharacterized protein Cllorf73 homologue; <i>Gallus gallus</i>	Cy			6.6	1	5.1
QSZJL9	SAM domain and HD domain-containing protein 1; <i>Gallus gallus</i>	Nu	DR	CA	4.1	2	4.9
QSZLF6	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Mb	T		4.6	1	4.6
Q802A0	histidine ammonia-lyase; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	6.2	2	4.5
Q6U7I1	isoform 1 of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7; <i>Gallus gallus</i>	Nu	MP	CA	5.4	3	4.5
QSZM11	arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	3.8	1	4.5
QSZMN7	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	3.5	2	4.4
Q5F3X5	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>			PB	6	1	4.1
QSZK86	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	4.8	1	4.0
QSZJP4	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	6.7	1	3.7
Q9PWC6	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; <i>Gallus gallus</i>				3.1	3	3.6
QSZL34	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6; <i>Gallus gallus</i>	Nu	MP	NB	6.9	1	3.6
QSZLI9	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cy	MP	CA	3	1	3.0
Q8AWB7	SMC1 protein cohesin subunit; <i>Gallus gallus</i>	Mb	CO	CA	2.3	1	2.4
P47990	xanthine dehydrogenase/oxidase; <i>Gallus gallus</i>	Cy	CDi	CA	3.3	1	2.2
QSZME3	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>		MP	CA	1.1	1	0.9
QSZIC1	putative uncharacterized protein; <i>Gallus gallus</i>	Cv	CC	CA	1.5	1	0.8

<sup>a</sup>The main cellular component (CC), biological process (BP) and molecular function (MF) are presented for each protein. The peptide count corresponds to peptide with a FDR < 1.3%. The protein abundance index (PAI) is calculated as indicated in Material and Methods. Abbreviations: (cellular component) Cy, cytoplasm; Csk, cytoskeleton; EC, extracellular; Go, Golgi apparatus; Mb, membrane; Nu, nucleus; Pr, proteasome; Ri, ribosome; Sp, spliceosome; (biological process) CC, cell communication; CDi, cell differentiation; CM, cell motility; CO, cell organization; COa, coagulation; DR, defense response; MP, metabolic process; RBP, regulation of biological process; RS, response to stimulus; T, transport; (molecular function) CA, catalytic activity; E, enzyme regulator activity; MB, metal ion binding; NB, nucleotide binding; PB, protein binding; Sig, signal transducer activity; Str, structural molecule activity; T, transporter activity; TA, translation regulator activity.

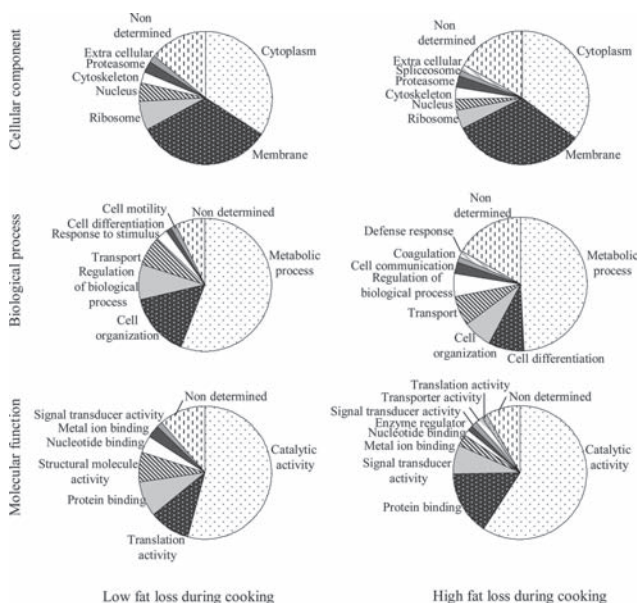


Figure 4. Distribution of main cellular component, biological process, and molecular function in both groups of fat loss, for specific proteins in low ( $n = 70$ ) and high ( $n = 71$ ) fat loss group, in the NS protein fraction.

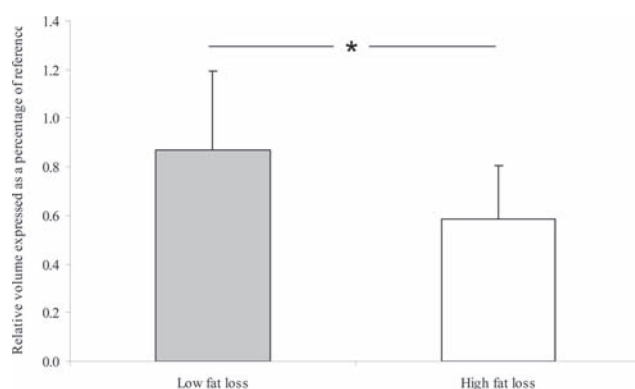
dynamic synthesis of constituents and particularly proteins. To validate this result, we chose to study more specifically the mitochondrial carrier homologue protein (MIMP). We performed Western blot analysis on a second set of samples to make a validation on a biological replicate. We analyzed the expression of MIMP in each fat loss group (Figure 5). The results showed a higher expression in the low fat loss group, which is

Table 5. Analysis with the GO Database of the 13 Groups of Proteins from NS Fraction Over-represented in the Low Fat Loss Group

Cellular Component
ribosome $p = 5.3 \times 10^{-5}$
ribosomal subunit $p = 4.8 \times 10^{-4}$
eukaryotic translation initiation factor 3 complex $p = 4.8 \times 10^{-4}$
ribonucleoprotein $p = 5.2 \times 10^{-4}$
Biological Process
translation $p = 2.3 \times 10^{-5}$
formation of translation initiation complex $p = 5.3 \times 10^{-5}$
Molecular Function
structural constituent of ribosome $p = 5.2 \times 10^{-5}$
translation factor activity, nucleic acid binding $p = 1.0 \times 10^{-3}$
rRNA binding $p = 3.0 \times 10^{-3}$

consistent with results obtained by shot-gun approach. The MIMP could thus be a good marker of the fat loss during cooking early post-mortem.

Comparison of the localization of the proteins (474 clusters) detected in both samples did not reveal any differences. Approximately half of the proteins are involved in metabolic processes (Figure 4), regardless of the fat loss during cooking, which is consistent with the result of molecular function, which showed that more than half of these proteins have catalytic activity (Figure 4). These results confirm the relevance of using the shotgun method for the analysis of the NS protein fraction because a larger spectrum of cellular components is pointed out by this method compared to 2D electrophoresis.



**Figure 5.** Relative amounts of MIMP protein obtained by using Western blots from NS protein fraction at 20 min post-mortem. For each fat loss group ( $n = 13$  and  $11$  for low and high fat loss, respectively), results are reported as the mean  $\pm$  standard deviation.

The results obtained from both protein fractions were consistent and demonstrated the complementarity of both methods in the study of liver physiology. Despite the low number of identified spots, the proteomic analysis of the protein fraction soluble at low ionic strength early post-mortem allowed us to better understand the phenomenon of fat loss during cooking. Overall, in the livers that will have a low fat loss during cooking, the anabolism pathways are more intense, whereas in the livers that will have a high fat loss during cooking, the overexpressed proteins are mainly involved in oxidoreduction processes, probably because they reached a more advanced biological stage of steatosis. We can hypothesize that differences in the ability to accumulate lipids in the liver may lead to various states of steatosis development after a standard period of overfeeding, thus explaining part of the variability in the technological quality observed under industrial conditions. These results are in agreement with practical observations showing that a reduced duration of overfeeding improves the technological yield of duck fatty livers by reducing the fat loss during cooking.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +33 5 34 32 39 06. Fax: +33 5 34 32 39 01. E-mail: molette@ensat.fr.

### Funding Sources

The financial supports of INRA, CIFO, and Région Midi-Pyrénées enabled the implementation of this project.

## ACKNOWLEDGMENT

Ducks were slaughtered and processed under the facilities of the Lycée Agricole de Périgueux (EPLFPA, 24, France). We are indebted to François Héroult (EPLFPA) for technical supervision of the slaughter process and to Hélène Manse, Madonna Chin, Romain Dinis, Corinne Pautot, and Stéphane Seidlinger for technical assistance. We thank Alain Vignal (UMR INRA INPT, LGC) for kindly providing the duck EST database for protein identifications and Christine Rousseau (INP ENSAT) for setting up the database.

## REFERENCES

(1) Journal Officiel de la République Française, 1993, Décret n° 93-99 du 09-08-93 du JO du 14-08-93, relatif aux préparations à base de foie gras.

(2) Rousselot-Pailley, D.; Guy, G.; Gourichon, D.; Sellier, N.; Blum, J. C. Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA, Prod. Anim.* **1992**, *5*, 167–172.

(3) Latil, G.; Auvergne, A.; Babilé, R. Consommation du canard mulard en gavage. Relation avec les performances zootechniques et la qualité du foie gras. *2ème Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France* **1996**, 93–97.

(4) Baudonnet-Lenfant, C.; Auvergne, A.; Babilé, R. Influence de la durée de jeûne avant l'abattage et du poids à la mise en gavage des canards de Barbarie sur la composition chimique hépatique. *Ann. Zoot.* **1991**, *40*, 161–170.

(5) Bouillier-Oudot, M.; Leprettre, S.; Dubois, J. P.; Babilé, R. Itinéraires *post mortem* et caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras d'oies. *Sème Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Pau, France* **2002**, 172–175.

(6) Blum, J. C.; Salichon, M. R.; Guy, G.; Rousselot-Pailley, D. Comparative development, chemical composition and quality of ducks and goose 'foie gras' obtained by cramming. *XIX World's Poultry Congress; WPSA: Amsterdam, The Netherlands, 1992*; pp 240244

(7) Baudonnet, C. *Facteurs de variation de la composition biochimique et de la qualité technologique des foies gras de canards*. Thèse de Doctorat, INP, Toulouse, France, 1993.

(8) Molee, W.; Bouillier-Oudot, M.; Auvergne, A.; Babilé, R. Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **2005**, *141*, 437–444.

(9) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.

(10) Bergmeyer, H. U. In *Methods of Enzymatic Analysis*; Bourne, G. H., Ed.; Academic Press: New York, 1974; pp 1127, 1196, 1238, 1464.

(11) Oliver, C. N.; Alin, B. W.; Moerman, E. J.; Goldstein, S.; Stadtman, E. R. Age related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5488–5491.

(12) Mercier, Y.; Gatellier, Ph.; Viau, M.; Rémygnon, H.; Renner, M. Effect of dietary fat and vitamin E on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Sci.* **1998**, *48*, 301–317.

(13) Lynch, S. M.; Frey, B. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 1745–1751.

(14) Sayd, T.; Morzel, M.; Chambon, C.; Franck, M.; Figwer, P.; Larzul, C.; Le Roy, P.; Monin, G.; Cherel, P.; Laville, E. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranous muscle: Implications on meat color development. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (7), 2732–2737.

(15) Morzel, M.; Chambon, C.; Lefèvre, F.; Paboeuf, G.; Laville, E. Modification of trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle proteins by pre-slaughter activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2997–3001.

(16) Meunier, B.; Bouley, J.; Picc, I.; Bernard, C.; Picard, B.; Hocquette, J. F. Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **2005**, *340*, 226–230.

(17) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.

(18) Borderies, G.; Jamet, E.; Lafitte, C.; Rossignol, M.; Jauneau, A.; Boudart, G.; Monsarrat, B.; Esquerré-Tugayé, M. T.; Boudet, A.; Pont-Lezica, R. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3421–3432.

(19) Bouyssié, D.; Gonzales de Peredo, A.; Mouton, E.; Albigot, R.; Roussel, L.; Ortega, N.; Cayrol, C.; Burlet-Schiltz, O.; Girard, J. P.; Monsarrat, B. Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate and quantify proteomics data generated by ICAT and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. *Mol. Cell Proteomics* **2007**, *6* (9), 1621–1637.

(20) Liu, H.; Sadygov, R. G.; Yates, J. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (14), 4193–4201.

- (21) Zhu, M.; Smith, J. W.; Huang, C. M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, doi: 10.1155/2010/840518.
- (22) Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 4350–4354.
- (23) Zhu, L. H.; Meng, H.; Duan, X. J.; Xu, G. Q.; Zhang, J.; Qong, D. Q. Gene expression profile in the liver tissue of geese after over-feeding. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 107–117.
- (24) Bax, M. L.; Chambon, C.; Marty-Gasset, N.; Rémignon, H.; Fernandez, X.; Molette, C. Proteomic profile evolution during steatosis development in duck. *Poult. Sci.* **2011** (DOI: 10.3382/ps.2011-01663).
- (25) Greco, D.; Kotronen, A.; Westerbacka, J.; Puig, O.; Arkkila, P.; Kiviluoto, T.; Laitinen, S.; Fisher, R. M.; Hamsten, A.; Auvinen, P.; Yki-Järvinen, H. Gene expression in human NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *294*, 1281–1287.
- (26) Jo, C.; Ahn, D. U. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poult. Sci.* **1999**, *77*, 475–480.
- (27) Iff, J.; Wang, W.; Sajic, T.; Oudry, N.; Gueneau, E.; Hopfgartner, G.; Varesio, E.; Szanto, I. Differential proteomic analysis of STAT6 knockout mice reveals new regulatory function in liver lipid homeostasis. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4511–4524.
- (28) Sreekumar, R.; Rosado, B.; Rasmussen, D.; Charlton, M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2003**, *38* (1), 244–251.
- (29) Yamaguchi, M. Role of regucalcin in calcium signaling. *Life Sci.* **2000**, *66* (19), 1769–1780.
- (30) Yamaguchi, M.; Kanayama, Y. Enhanced expression of calcium binding protein regucalcin mRNA in regenerating rat liver. *J. Cell Biochem.* **1995**, *57* (2), 185–190.
- (31) Roberts, L. R.; Adjei, P. N.; Gores, G. J. Cathepsins as effector proteases in hepatocytes apoptosis. *Cell Biochem. Biophys.* **1999**, *30*, 71–88.
- (32) Kirpich, I. A.; Gobejishvili, L. N.; Bon Homme, M.; Waigel, S.; Cave, M.; Arteel, G.; Barve, S. S.; McClain, C. J.; Deaciuc, I. V. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* **2010**, *22* (1), 38–45.
- (33) Federico, A.; Tuccillo, C.; Terracciano, F.; D'Alessio, C.; Galdiero, M.; Finamore, E.; D'Isanto, M.; Peluso, L.; Del Vecchio Blanco, C.; Loguercio, C. HSP 27 expression in patients with chronic liver damage. *Immunobiology* **2005**, *209*, 729–735.
- (34) Mölleken, C.; Sitek, B.; Henkel, C.; Poschmann, G.; Sipos, B.; Wiese, S.; Warscheid, B.; Broelsch, C.; Reiser, M.; Friedman, S. L.; Tornøe, I.; Schlosser, A.; Klöppel, G.; Schmiegel, W.; Meyer, H. E.; Holmskov, U.; Stühler, K. Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis. *Hepatology* **2009**, *49* (4), 1257–1266.
- (35) Atzori, L.; Poli, G.; Perra, A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 1639–1642.
- (36) Bénard, G.; Labie, Ch. Evolution histologique du foie des palmipèdes au cours du gavage. *3ème Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France* **1998**, 31–35.
- (37) Gabarrou, J. F.; Salichon, M. R.; Guy, G.; Blum, J. C. Hybrid ducks overfed with boiled corn develop an acute hepatic steatosis with decreased choline and polyunsaturated fatty acid level in phospholipids. *Reprod. Nutr. Dev.* **1996**, *36*, 473–484.