



HAL
open science

Détection des foies gras de canard ayant subi un processus de congélation-décongélation

Marie-Christine Bourin, Antoine Vautier, Corinne C. Rondeau-Mouro, Guylaine Collewet, Maëva Halgrain, Laurent Aubry, Laëtitia Théron

► **To cite this version:**

Marie-Christine Bourin, Antoine Vautier, Corinne C. Rondeau-Mouro, Guylaine Collewet, Maëva Halgrain, et al.. Détection des foies gras de canard ayant subi un processus de congélation-décongélation. *Innovations Agronomiques*, 2024, 94, pp.99-114. 10.17180/ciag-2024-vol94-art07 . hal-04601125

HAL Id: hal-04601125

<https://hal.inrae.fr/hal-04601125>

Submitted on 4 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



Détection des foies gras de canard ayant subi un processus de congélation-décongélation

Marie BOURIN¹, Antoine VAUTIER², Corinne RONDEAU-MOURO³, Guylaine COLLEWET³, Maeva HALGRAIN¹, Laurent AUBRY⁴, Laetitia THERON⁴

¹ITAVI, Experts des filières avicole, cunicole et piscicole, Domaine de l'Orfrasière, 37380 Nouzilly, France

²IFIP, Institut du porc, La motte au Vicomte 35651 Le Rheu cedex, 35651 Le Rheu Cedex, France

³INRAE, UR OPAALE, 17 Av. de Cucillé, CS 64427, 35044 Rennes Cedex, France

⁴INRAE, Centre de recherche Clermont-Auvergne-Rhone-Alpes, 63122 St Genes Champanelle, France

Correspondance : bourin@itavi.asso.fr

Résumé

La vente de foies gras de canards frais est essentiellement concentrée sur la période des fêtes de fin d'année, créant un déséquilibre entre la demande des consommateurs français et la disponibilité du produit. Certains acteurs du marché français sont alors tentés de congeler les foies gras de canards pour les vendre en frais, ce qui est pourtant une pratique interdite par les réglementations française et européenne. Les abatteurs souhaiteraient pouvoir qualifier les produits vendus en frais, afin de s'assurer qu'ils sont bien conformes à la réglementation. Pour répondre à cet objectif, nous avons développé une méthodologie de détection des foies gras ayant subi un processus de congélation – décongélation. Dans notre étude, 5 méthodes ont été testées : mesure de l'oxydation des produits, empreintes par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Dissociation ionization – Time_Of-Flight), spectroscopie en proche infrarouge (NIRS), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), IRM et conductivité. Lors de la première phase du projet, sur des foies provenant d'un même lot et calibrés en poids, les empreintes MALDI-TOF arrivaient à bien classer les foies avec des pourcentages de validation interne et de capacité de reconnaissance compris entre 93 % et 100 %. De même, la méthode NIRS a montré qu'il était possible de mettre au point des calibrations avec des coefficients de détermination des modèles de calibration (R^2c) de 0,82, et de validation croisée (R^2cv) de 0,80. Lors de la seconde phase du projet, de la variabilité a été intégrée dans la provenance des foies afin de disposer d'un modèle spécifique de la congélation/décongélation et utilisable sur des foies tout-venants. Les méthodes MALDI-TOF et NIRS ont permis de reconnaître les foies gras congelés, mais avec des erreurs de classification, et trop de variabilité pour pouvoir valider le modèle de la première phase. Une phase de validation de ces deux méthodes sur un pool plus important de foies gras, provenant de différents itinéraires techniques semble nécessaire pour avoir des équations de prédiction robustes et fiables. Quant aux mesures de RMN et d'IRM, malgré des résultats encourageants sur la première phase, ils n'ont pu être répétés sur des foies gras d'origine variée (différents abattoirs) du fait d'une mauvaise maîtrise de la chaîne du froid entre leur prélèvement et leur analyse.

Mots-clés : palmipèdes, foies gras, MALDI TOF, NIRS, RMN, IRM

Abstract: Detecting duck fatty livers with freezing-thawing steps

Sales of fresh duck fatty livers (foies gras) are mainly concentrated during the festive season, creating an imbalance between French consumer demand and product availability. As a result, some operators on the French market are tempted to freeze duck fatty livers in order to sell them fresh, a practice prohibited by French and European regulations. Slaughterers would like to be able to qualify products sold fresh, to ensure that they comply with regulations. To meet this objective, we developed a methodology for detecting fatty livers that have undergone a freezing-thawing process. In our study, 5 methods were tested: measurement of product oxidation, fingerprinting by MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser



Dissociation ionization - Time_Of-Flight) mass spectrometry, near infrared spectroscopy (NIRS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), MRI and conductivity. In the first phase of the project, MALDI-TOF fingerprints were able to classify livers from the same batch, calibrated by weight, with internal validation and recognition percentages ranging from 93 % to 100 %. Similarly, the NIRS method showed that it was possible to develop calibrations with model determination coefficients (R^2c) of 0.82, and cross-validation coefficients (R^2cv) of 0.80. In the second phase of the project, variability was incorporated into the origin of the livers, in order to provide a model specific to freezing/thawing and usable on all-origin livers. The MALDI-TOF and NIRS methods were able to recognize frozen fatty livers, but with classification errors and too much variability to validate the first-phase model. A validation phase of these two methods on a larger pool of fatty livers, from different technical itineraries seems necessary to have robust and reliable prediction equations. As for NMR and MRI measurements, despite encouraging results in the first phase, they could not be repeated on fatty livers of various origins (different slaughterhouses) due to poor control of the cold chain between sampling and analysis.

Keywords: duck, fatty livers, MALDI TOF, NIRS, NMR, MRI

1. Introduction

La vente de foies gras de canards frais est essentiellement concentrée sur la période des fêtes de fin d'année, ce qui conduit à ce moment-là à un déséquilibre entre la demande des consommateurs français et la disponibilité du produit. Certains acteurs du marché français sont alors tentés de congeler les foies gras de canards pour les vendre en frais au moment des fêtes de fin d'année, ce qui est une pratique interdite (*Règlement (UE) n ° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil du 17 décembre 2013 portant organisation commune des marchés des produits agricoles et abrogeant les règlements (CEE) n ° 922/72, (CEE) n ° 234/79, (CE) n ° 1037/2001 et (CE) n ° 1234/2007 du Conseil, 2013*). En effet, la viande de volaille et les préparations à base de viande de volaille ne sont commercialisables qu'à l'état frais, congelé, surgelé. La commercialisation des foies de volaille décongelés n'est donc pas autorisée en France et en Europe. Il n'est pour l'instant pas possible d'identifier ces foies gras décongelés, alors que pouvoir qualifier les produits vendus en frais sur le marché français permettrait de s'assurer qu'ils sont bien conformes à la réglementation, surtout sur la période des fêtes de fin d'année, afin d'éviter la concurrence déloyale en régulant le marché. De plus, le consommateur ne peut pas détecter un foie gras de canard décongelé à l'œil nu et il est nécessaire pour sa protection de disposer d'une méthode permettant d'attester qu'il s'agit bien d'un produit frais.

La mise au point d'outils analytiques fiables et objectifs, pouvant permettre de discriminer des produits ayant subi une étape de congélation/décongélation, avant leur commercialisation en réfrigéré, pourrait permettre d'éviter des pratiques frauduleuses et contribuerait à assurer une plus grande loyauté des transactions commerciales. Au cours de ce projet, 5 méthodes ont été testées : mesure de l'oxydation des produits, empreintes par spectrométrie de masse MALDI-TOF, spectroscopie en proche infrarouge (NIRS, Near Infra Red Spectroscopy), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), IRM (imagerie par résonance magnétique) et conductivité.

L'empreinte spectrale de protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF est, depuis quelques années, devenue la méthode de référence pour l'identification des bactéries en hôpitaux (Nomura, 2015). Le spectre des protéines extraites d'une bactérie (ou empreinte spectrale) est comparé à une base de données et un score statistique est donné par le système permettant de valider ou non l'identification. Très récemment, des études ont également montré sa pertinence pour le contrôle de la durée de conservation de la truite par la création d'un outil de prédiction (Ulrich *et al.*, 2017). La discrimination des temps de conservation (0, 3, 7, 9 et 11 jours) a été réalisée avec un score de classification supérieur à 90 %. De plus, cette méthode spectrale a été utilisée pour la création d'une base de données de 54 espèces de poisson, pour le contrôle de l'adultération dans la filière piscicole (Stahl and Schröder, 2017).



La spectroscopie proche infrarouge (NIRS) est une technique rapide et non-invasive de prédiction de la composition chimique des produits agroalimentaires. La spectroscopie proche infrarouge est utilisée avec succès depuis de nombreuses années sur la matrice viande, pour la prédiction de la composition chimique et ce pour plusieurs espèces : la teneur en lipides intramusculaires est prédite avec des modèles à fort ajustement pour la viande de porc ($R^2 = 0,84$, Liao *et al.*, 2010), agneau ($R^2 = 0,84$, Andrés *et al.*, 2007), bovin ($R^2 = 0,99$, De Marchi *et al.*, 2007), canard ($R^2 = 0,84$, Bastianelli *et al.*, 2009) et poulet ($R^2 = 0,83$, Chartrin P., 2010). Sur des matrices plus riches en lipides et dont la composition est plus proche de celle du foie gras frais telles que les mélanges gras/maigre ou les saucisses, les modèles de prédiction NIRS révèlent également un niveau de précision élevé avec la teneur en lipides ($R^2 = 0,83$ et $0,99$, Gaitán-Jurado *et al.*, 2008; Tøgersen *et al.*, 1999). Les données disponibles sur la prédiction spécifique de la composition chimique du foie gras frais sont plus rares, mais elles mettent en évidence des résultats prometteurs, notamment pour le taux de lipides ($R^2c = 0,81$ à $0,89$; Marie-Etancelin *et al.*, 2011; Molette *et al.*, 2001). Par ailleurs, la NIRS a permis de reconnaître 95 % à 98 % des steaks de bœuf ayant été congelés puis décongelés (Thyholt and Isaksson, 1997). La même technique appliquée au poisson a permis à Uddin and Okazaki (2004) de discriminer sans erreur des maquereaux frais de maquereaux ayant été congelés puis décongelés.

La RMN et l'IRM permettent de mettre en évidence la structure des matrices étudiées et l'état de l'eau au sein de ces matrices, notamment alimentaires. La méthode de RMN est basée sur la détection des protons, noyaux de l'hydrogène constituant les molécules. En sciences alimentaires, l'eau et les lipides sont les molécules les plus étudiées par ces techniques de par leur abondance dans les aliments et grâce à une mobilité moléculaire facilement mesurable via les temps de relaxation T1 et T2, paramètres intrinsèques de la technique. Ainsi, l'utilisation de la relaxométrie par RMN sur la chair animale permet de prédire la capacité de rétention en eau (Bertram *et al.*, 2002; Gudjonsdottir *et al.*, 2010; Lambelet *et al.*, 1995) et ainsi de quantifier l'exsudat produit après décongélation du produit. Il a en outre été montré que le type de refroidissement sur la viande de porc ou la chair de poisson induisait une différence des temps de relaxation T2 de l'eau (Bertram *et al.*, 2002; Gudjonsdottir *et al.*, 2010). En ce qui concerne l'IRM, basée sur les mêmes principes physiques que la RMN mais avec une résolution spatiale des protons, elle a été utilisée pour étudier l'effet de la congélation/décongélation principalement sur les fruits et légumes, la viande et la chair de poisson. Une étude sur la viande de bœuf, porc et agneau a conclu que la variabilité naturelle des produits ne permettait pas d'identifier aisément les produits frais des produits congelés-décongelés (Evans *et al.*, 1998). Les indicateurs utilisés étaient les temps T1, T2 et le taux de transfert de magnétisation (TTM). Les mêmes indicateurs ont été utilisés sur la morue et le maquereau (Nott *et al.*, 1999, IRM 2.35T). Les variations de signal sur des images pondérées en T1 et T2 ont été étudiées sur du Turbot et ont montré une évolution du signal dans les images après plusieurs cycles de congélation/décongélation (Li *et al.*, 2018). Ainsi sur la base des publications citées, la combinaison des techniques de RMN et d'IRM, connues pour leur caractère non invasif et non destructif, semblent appropriées pour étudier les phénomènes liés à la congélation/décongélation des produits tels que les foies gras crus.

2. Matériels et méthodes

2.1 Préparation des foies

L'étude a été décomposée en 2 phases successives.

Lors de la première phase de l'étude, les mesures et prélèvements ont été réalisés sur les mêmes foies ($n = 100$), afin d'éviter toute variabilité et s'assurer que les résultats obtenus étaient en lien direct avec le processus de congélation/décongélation. Chacun des foies était coupé en deux (coupe sagittale) et les deux parties étaient affectées alternativement à une mesure sur foie frais le jour de l'abattage (J0) puis



après 2 semaines de conservation à 5 °C (J14), ou à une mesure sur foies congelés pendant 6 mois et décongelés (M6), puis à une mesure supplémentaire après 2 semaines de conservation à 5 °C (M6+J14).

Lors de la seconde phase de l'étude, plusieurs modalités ont été intégrées afin d'augmenter les sources de variabilité non spécifique du procédé de congélation/décongélation et se rapprocher de la réalité terrain (Tableau 1) :

- **Individu** : le traitement congélation / décongélation est appliqué à une population différente du témoin.
- **Poids** : 3 gammes de foies (<500g, 500-600g, >600g)
- **Température de conservation du foie en frais** : 3 températures (4°C, 0°C et 8°C)
- **Durée de conservation en frais** : 3 modalités (0 jour, 7 jours, 14 jours)
- **Durée de congélation** : 2 durées (3 mois et 6 mois)
- **Abattoir de provenance** : 3 abattoirs

Tableau 1 : Les modalités testées lors de la seconde phase du projet, intégrant de la variabilité afin de se rapprocher de la réalité du terrain.

Traitement	Durée de conservation (en jours)	Conservation (température en °C)	Gamme de poids	Effectifs abattoir 1	Effectifs abattoir 2	Effectifs abattoir 3
Frais	-	-	< 500g	5	5	5
			500 - 600g	5	5	5
			> 600g	5	5	5
Frais	7	0	< 500g			5
			500 - 600g			5
			> 600g			5
Frais	7	4	< 500g		5	5
			500 - 600g		5	5
			> 600g		5	5
Frais	7	8	< 500g		5	
			500 - 600g		5	
			> 600g		5	
Frais	14	4	< 500g	5	5	5
			500 - 600g	5	5	5
			> 600g	5	5	5
Surgelés janvier	2	4	< 500g	5		6
			500 - 600g	5		7
			> 600g	5		7
Surgelés janvier	7	4	< 500g	6		
			500 - 600g	7		
			> 600g	7		
Surgelés janvier	14	4	< 500g			6
			500 - 600g			7
			> 600g			7
Surgelés mars	2	4	< 500g	5	6	
			500 - 600g	5	7	
			> 600g	5	7	
Surgelés mars	7	4	< 500g	6		
			500 - 600g	7		
			> 600g	7		
Surgelés mars	14	4	< 500g		6	
			500 - 600g		7	
			> 600g		7	



2.2 MALDI-TOF

La préparation des échantillons en amont de l'analyse par MALDI-TOF a été optimisée de la méthode publiée par Théron *et al.* (2020). La dernière étape a porté sur les analyses statistiques par chimiométrie des données spectrales de protéines en MALDI-TOF avec le logiciel ClinProTools. Tout d'abord, les paramètres de détermination de la liste de pics ont été optimisés (rapport signal sur bruit de fond de 3, algorithme de lissage des spectres Savitzky-Golay). Afin de pouvoir classifier les foies, un modèle de prédiction a été construit sur la base de l'algorithme de réseau de neurones. Pour cela, une approche par validation interne, dite cross-validation, a été mise en œuvre : 80 % des données sont utilisées pour construire le modèle et les 20 % restantes pour le valider, c'est-à-dire sont classées en utilisant le modèle. Ces données sont sélectionnées de façon aléatoire par le logiciel et l'opération est répétée 10 fois pour être le plus complet et représentatif possible. Le réseau de neurones s'est montré le plus pertinent pour discriminer les foies gras selon le mode de conservation/congélation. Le modèle créé a été validé en interne par cross-validation et en externe avec un nouveau jeu de données.

2.3 Spectrométrie dans le proche infrarouge

Le matériel utilisé consistait en un spectromètre Labspec4 ASDI (350-2500 nm) équipé de sa sonde de contact (fenêtre de 2 cm de diamètre). La résolution spectrale est de 3nm dans la gamme 350-1000 nm et de 10 nm dans la gamme 1000-2500 nm Le temps d'intégration a été fixé à 10 msec et chaque spectre est constitué de la moyenne de 10 répétitions, ce qui totalise une mesure d'une seconde par échantillon. Les spectres sont exprimés en indice de réflexion. Les calibrations ont été réalisés à l'aide du logiciel Matlab et de la toolbox Eigenvector et de la procédure d'analyse discriminante PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis). La détermination des modèles de prédiction a été effectuée par le suivi de l'erreur de validation croisée en fonction du nombre de facteurs PLS inclus dans le modèle (20 tirages aléatoires). Les performances des modèles ont ensuite été évaluées par l'erreur de prédiction obtenue sur un jeu de donnée de validation externe. Pour calculer le R^2 , la valeur numérique de la classe (0 ou 1) a été prise en compte, ce qui permet de donner toutefois un point de comparaison entre le niveau d'ajustement de plusieurs modèles. Le critère de performance le plus important reste le pourcentage de foies bien classés d'après la probabilité d'appartenir à une classe fournie par le modèle.

2.4 Méthodes spectroscopiques et d'imagerie par RMN et IRM

Contrairement aux autres méthodes, les analyses ont été effectués au laboratoire en raison de la non-mobilité des appareils de mesure, notamment l'IRM. Les foies gras, livrés par camion frigorifique à environ 4 °C, étaient conservés à cette température dans une chambre froide. Le J0 représentait le jour suivant la livraison, et le J14, deux semaines après le J0. Pour la phase 2, les foies frais et congelés ont été prélevés à l'abattoir et expédiés au laboratoire à 4 °C et réceptionnés le lendemain.

Les mesures de RMN ont été effectuées sur un spectromètre à 20 MHz (minispec, Bruker) avec des prélèvements cylindriques d'environ 8 mm de diamètre et 1 cm de hauteur placés dans des tubes en verre dédiés. Trois échantillons ont été prélevés par foie. Les temps de relaxation T2 ont été mesurés à différentes températures (-10 °C, 4 °C, 10 °C, 20 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C) via la séquence FID-CPMG (Free Induction Decay-Carl Pucell Meiboom & Gil) (Meiboom and Gill, 1958), et les temps de relaxation T1 via la séquence FSR (Fast Saturation Recovery) (Fukushima and Roeder, 2018) à 4 °C. Les mesures de T1 ont été effectuées afin d'optimiser les mesures de T2 (séquence FID-CPMG avec un temps de recyclage de 4 s). A 4 °C, ces dernières utilisaient un temps d'écho de 0,1 ms et l'accumulation de 2 600 échos. Pour extraire les temps de relaxation T2 des données brutes, chaque signal a été modélisé selon l'équation 1 suivante :

$$I(t) = \sum_i A_i e^{-t/T_{2i}} \quad \text{Équation 1}$$

Où A_i représente l'amplitude de la ième composante caractérisée par un temps de relaxation T_{2i} .

Une analyse de variance a été effectuée sur l'ensemble des mesures de T2 à l'aide du logiciel Statgraphics, utilisant le test F de l'ANOVA pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes de foies gras.

L'IRM a été utilisée dans ce projet avec trois protocoles distincts. Deux protocoles ont visé l'estimation de cartographies de paramètres, à savoir le temps de relaxation T2 et le taux de lipide. Un seul plan en deux dimensions a été réalisé, avec une résolution spatiale de 1,5 x 1,5 mm² et une épaisseur de coupe de 4 mm, pour ces deux protocoles. Le troisième protocole avait pour objectif l'observation d'éventuelles modifications de la structure macroscopique, avec une acquisition en 3D, offrant une résolution spatiale de 1 x 1 x 0,8 mm³. Les images IRM ont été acquises sur un appareil à 1,5T, Avanto de Siemens, avec la possibilité d'analyser les foies à différentes températures. Les mesures ont été effectuées à 4 °C et à 25 °C. Pour minimiser les variations spatiales de l'intensité des images, les foies ont été analysés un par un, positionnés au même endroit. Les acquisitions en 3D ont été effectuées deux par deux en raison de leur plus longue durée. La mesure du taux de lipides est basée sur la différence de fréquence du signal de l'eau et des lipides ce qui permet de séparer ces deux signaux, d'en calculer un ratio mais également de les analyser séparément (Hu *et al.*, 2012).

3. Résultats et discussion

3.1 MALDI-TOF

Les 600 spectres individuels de protéines acquis dans le cadre du volet 1 sont représentés dans la figure suivante 1.

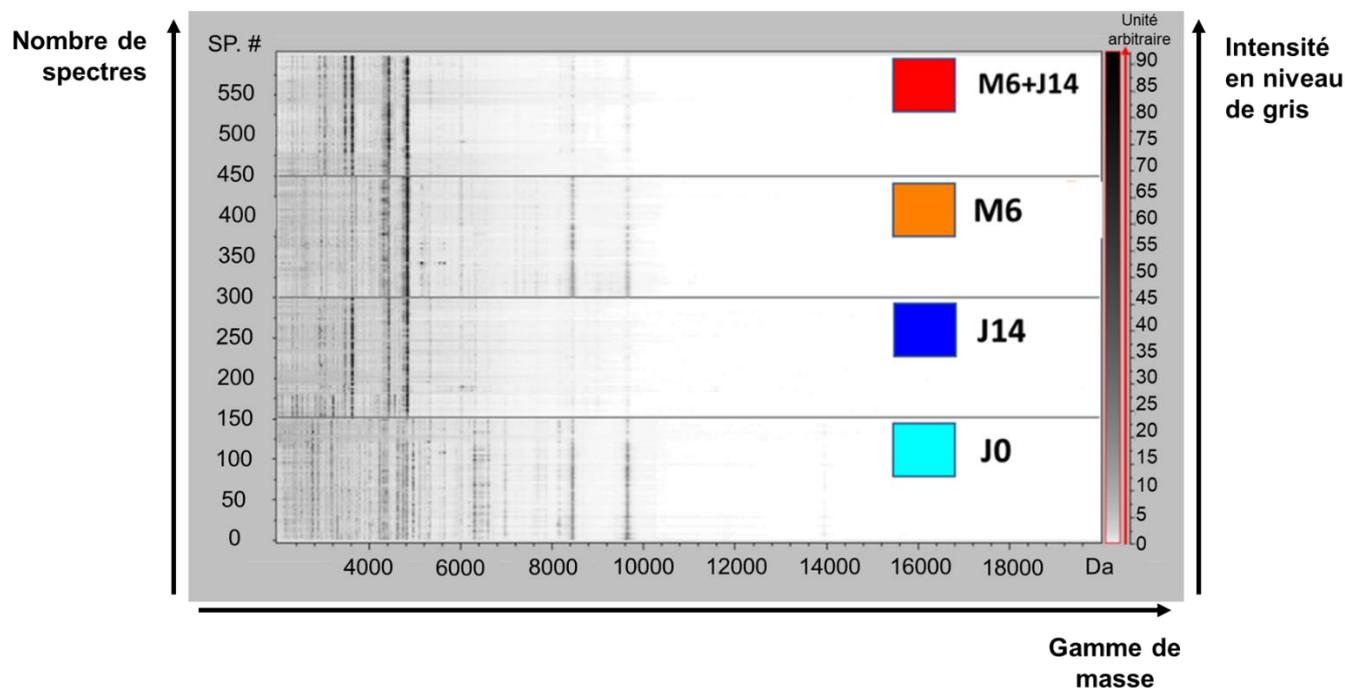


Figure 1 : Visualisation des spectres MALDI-TOF obtenus sur les foies analysés lors de la phase 1

La visualisation sous forme de gel permet de montrer la variabilité inter et intra-individuelle. Cette représentation montre que certaines différences sont présentes entre les 4 conditions avec la présence de pics (représentés par les barres verticales dans la Figure 1) uniquement dans les conditions sans conservation à 4 °C par exemple. La mise en œuvre des statistiques permet de déterminer si ces différences sont significatives.



Les résultats obtenus sont évalués grâce à la capacité de reconnaissance donnée par le logiciel. Il s'agit de l'évaluation de la capacité du modèle à classer de nouvelles données sur la base du jeu de données d'entrée.

Les résultats sont donnés par classe dans la Figure 2.

Dans le cas des empreintes de foies gras, les résultats sont positifs et homogènes entre classes avec des pourcentages de validation interne et de capacité de reconnaissance compris en 93 % et 100 %. Ce résultat de capacité de prédiction de la congélation et conservation des foies gras est basé sur l'intensité de 24 pics sur toute la gamme de masse analysée. Les intensités de ces 24 pics forment l'équation de prédiction de l'appartenance aux 4 classes.

Lors de la seconde phase du projet, l'accent a été mis sur la prise en compte de la variabilité des conditions potentiellement rencontrée sur le terrain. Pour cette seconde phase, il a été décidé de regrouper les différentes conditions, en regroupant les foies quelle que soit leur gamme de poids et quel que soit l'atelier dans lequel ils ont été prélevés puisque cela ne devrait pas être l'information prépondérante d'une bonne méthode de classification utilisable sur le terrain.

Cette approche est plus simple à appréhender puisqu'elle ne porte que sur les 4 classes décrites dans la phase 1, à savoir J0, J14, M6 et M6+J14. Les résultats de classification en regroupant les conditions de la phase 2 sont représentés dans la figure 3.

		"Validation Interne"	"Capacité de Reconnaissance"
		98.33 %	98.16 %
J0		98.67 %	99.33 %
J14		95.30 %	93.29 %
M6		100 %	100 %
M6+J14		99.33 %	100 %

Figure 2 : Classement des foies issus de la phase 1 par les empreintes MALDI TOF



	J0	J14	M6	M6+ J14
Foies gras frais	1	36	97	4
Foies gras frais conservés	60	58	197	1
Foies gras surgelés	12	33	165	1
Foies gras surgelés conservés	55	126	33	27

Figure 3 : Classification des foies de la phase 2

La diagonale représentée par les encadrés correspond au résultat attendu. Le classement selon les 4 classes confirme les résultats détaillés pour chaque condition : les foies gras congelés sont relativement bien reconnus par le modèle. Néanmoins, il y a trop de mauvaises classifications, et trop de variabilité pour pouvoir valider le modèle créé avec les données d'empreintes spectrales de protéines des foies gras de la phase 1.

Il apparaît que le modèle présente un « sur-apprentissage », il est très spécifique des conditions de la phase 1, trop spécifique pour pouvoir être utilisé pour classifier des empreintes spectrales acquises lors d'expérimentations complémentaires. Lorsqu'il est confronté à des données plus réalistes, il perd de la puissance de classification.

3.2 Spectrométrie dans le proche infrarouge

Lors de la phase 1 du projet, les calibrations PLS-DA (analyse discriminante) basées sur les modifications de signatures spectrales dans le visible et dans le proche infrarouge ont révélé de bonnes performances de classification entre les demi-foies frais (J0 et J14) et les demi foies congelés/décongelés (M6 et M6 + J14) : les coefficients de détermination étaient d'un bon niveau en calibration ($R^2c = 0,82$) et stables en validation croisée ($R^2cv = 0,80$) alors que l'erreur de validation croisée se situait à 2 %.

Toutefois, des essais de calibrations ont été testés sur des sous-populations afin d'estimer la robustesse/spécificité des calibrations : un modèle a notamment été mis au point sur les lots mesurés à J14 et M6 + J14 puis une validation externe de ce modèle a été mise en œuvre sur les lots mesurés à J0 et J14 et M6 (congelés/décongelés). Les résultats étaient dans ce cas décevants avec une très forte baisse du coefficient de détermination en validation externe ($R^2p = 0,41$) et une erreur très forte (43 %).

Ces deux essais de calibration nous ont donc montré qu'il est tout d'abord possible de mettre au point des calibrations spécifiques du traitement congélation/décongélation du foie. Mais, nous en concluons également qu'il sera malgré tout indispensable d'intégrer toute sorte de variabilité susceptible de modifier la signature spectrale dans de futures calibrations afin de disposer d'un modèle robuste, spécifique de la congélation/décongélation et utilisable sur des foies tout-venants.

Lors de la phase 2 du projet, la variabilité sur la provenance des foies a été intégrée (Figure 4). Une première analyse de validation a tout d'abord été mise en œuvre en testant les modèles de l'action de calibration de la phase 1 sur la nouvelle population de foies gras. Cette validation externe a pu confirmer les problèmes de robustesse qui avaient été mis en évidence précédemment : le coefficient de détermination de la validation externe était très faible ($R^2p = 0,09$) et l'erreur de classification était forte (34 % de foies mal classés). Ces résultats nous ont poussés à considérer cette nouvelle population de



foies comme une base de données conçue spécifiquement pour la mise au point de calibrations robustes pour la détection des foies congelés/décongelés sur des lots de foies « tout venant ».

Afin de répondre à la fois aux besoins de mise au point de nouvelles calibrations robustes mais aussi aux objectifs de test de performance des modèles en validation externe propre à la phase 2, la population de 300 foies a été divisée en 2 (Figure 4)

- Sous-population de calibration/validation croisée : abattoirs 2 + 3 (n = 200)
- Sous-population de validation externe : abattoir 1 (n = 106)

Durée de conservation	Validation externe / n=106		Calibration / n=200			
	Abattoir 1		Abattoir 2		Abattoir 3	
	Frais	Surgelé	Frais	Surgelé	Frais	Surgelé
0 jour (T0)	15	20	15	20	15	30
7 jours (T7)	30	-	30	-	-	40
14 jours (T14)	21	20	15	20	15	-
Total	66	40	60	40	30	70

Figure 4 : Répartition des foies pour la phase 2 (nombre de foies pour chacune des modalités)

Les résultats des calibrations couplés avec les validations externes ont révélé des modèles fortement ajustés : R^2_c de 0,60 à 0,96 (calibration), R^2_{cv} de 0,59 à 0,91 (validation croisée) et R^2_p de 0,67 à 0,86 (Tableau 2). Les modèles étaient donc globalement robustes quel que soit le type de prétraitement de spectre mis en œuvre. Les modèles les plus simples étaient déjà précis avec 13 % d'erreur pour le modèle appliquant une simple correction de ligne de base et un léger lissage du signal (ordre 4). Ce modèle montre toutefois une erreur très déséquilibrée vers les faux négatifs, ce qui nuit fortement à la qualité de détection des foies. L'utilisation de la procédure GLSW (General Least Square Weighting) qui consiste en un filtre de sélection *a priori* des zones spectrales en lien avec la grandeur à prédire a cependant permis d'améliorer fortement la précision des modèles de classification : seulement 2 % d'erreur de classification avec une répartition faux positifs/faux négatifs assez équilibrée (37 %/63 %).



Tableau 2 : Synthèse des résultats de calibration et validation externe obtenu sur la répartition des données du volet 2

Calibrations 2020 Abattoirs 2+3 (n=200)				Validation externe 2020 Abattoir 1 (n=106)		
prétraitement	Nb facteurs PLS	R ² c	R ² cv	R ² p	% erreur	% faux positif / % faux négatif
RAW	5	0,81	0,79	0,73	25	0 / 65
AWLS2+SMOOTH4	2	0,60	0,59	0,67	13	0 / 35
AWLS2+SMOOTH4+AUTO	6	0,81	0,77	0,83	31	0 / 83
AWLS2+SMOOTH4+SNV	2	0,62	0,60	0,67	13	0 / 35
AWLS2+SMOOTH4+MSC	5	0,82	0,80	0,86	23	0 / 63
AWLS2+SMOOTH4+GLS ($\alpha=0,02$)	2	0,91	0,86	0,85	9	0 / 25
AWLS2+SMOOTH4+GLS ($\alpha=0,005$)	2	0,96	0,91	0,72	2	1,5 / 2,5

Meilleur modèle
PLS-da

3.3 Méthodes spectroscopiques et d'imagerie par RMN et IRM

3.3.1 RMN

La première phase du projet a permis de déterminer les paramètres de relaxation T2 des constituants principaux des foies gras, l'eau et la matière grasse. Leur évolution en fonction de la température a été étudiée afin de vérifier certaines lois physiques (lois de Curie et d'Arrhénius) influençant les paramètres de relaxation et l'intensité du signal de RMN. La Figure 5 présente l'allure des distributions en T2 des échantillons de foies gras à 4 °C et 80 °C.

L'augmentation de la température (entre 4 °C et 80 °C ici) induit une disparition nette de la première composante autour de 20 μ s et une augmentation des temps de relaxation (3), (4) et (5).

En analysant l'évolution en temps de relaxation et en intensité massique (non montré ici) de chaque pic de la distribution et en la comparant à celle de l'eau pure et des matières grasses extraites de foies gras, nous avons pu attribuer chaque composante (pic) T2 à des familles de protons.

A 4 °C sur les foies gras frais (J0), 6 temps de relaxation T2 ont été mesurés, dont voici l'attribution proposée :

- Le T2(1) autour de 13 μ s correspondrait aux matières grasses cristallisées majoritairement avec une petite fraction de protons non-échangeables des macromolécules.
- Les T2(2) et T2(2)' autour 550 μ s et 2,5 ms, respectivement, proviendraient des protons échangeables des macromolécules en interactions avec l'eau
- Le T3(3), T2(4) et T2(5) autour de 3,5 ms, 15 ms, 50 ms, respectivement, correspondraient à des mélanges eau/matière grasse.

On retrouve ces mêmes temps de relaxation avec des intensités proches pour des foies gras frais conservés 14 jours à 4 °C.

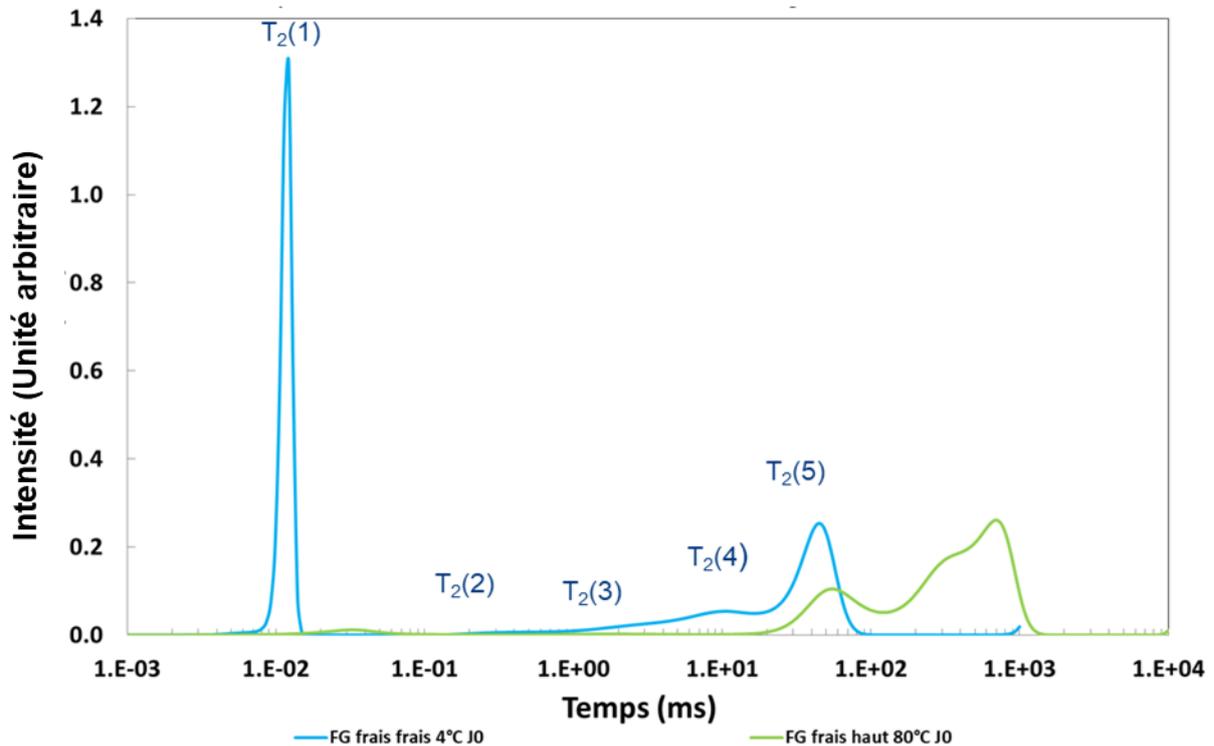


Figure 5 : Distributions des T2 à 4 et 80°C, d'échantillons de foies gras frais (j0)

Lors de la phase 2, la tâche consistait à effectuer des mesures de RMN sur 4 types de produits : des foies gras (FG) frais J0, des foies gras frais conservés à 4 °C pendant 14 jours (J14) et des foies gras surgelés/décongelés pendant 6 mois à J0 puis conservés à 4 °C pendant 14 jours (J14). Les mesures de RMN ont été réalisées sur 12 foies gras en prélevant 3 échantillons par foie. A la suite des mesures à 4 °C, chaque échantillon subissait l'itinéraire thermique décrit dans la section Matériels et méthodes. Après traitement mathématique des données de RMN afin d'en extraire les valeurs de T2 et leur intensité, une analyse statistique a été effectuée sur ces différentes variables afin de vérifier si les moyennes des groupes (FG frais J0, FG frais J14, Surgelés J, Surgelés J14) se distinguaient entre elles de façon significative. Les tests statistiques n'ont pas permis de distinguer de façon significative les FG frais des FG surgelés à J0. En effet, les tests ANOVA indiquent des valeurs du tests Fisher (LSD, *Least significant Difference*, différence la moins significative) assez faibles (< 60) entre les moyennes des temps de relaxation T2 ou de leur intensité. Seules les analyses effectuées en augmentant la température de mesure et en particulier à 40 °C ont montré des différences significatives des T2(3) entre les FG frais et les surgelés/décongelés. Rappelons que la composante T2(3) est attribuée à un mélange d'eau et de matière grasse. Il se peut que la surgélation des FG impacte la fraction cristallisée des matières grasses de telle sorte que leur décongélation et leur chauffage à 40 °C impacte ce pool de protons caractérisé par un T2(3) spécifique. L'ANOVA des moyennes de T2(3) mesurés à J0 confirme ces différences significatives (avec une probabilité de 95 %) avec des tests F assez élevés (> 1500) comme le montre la figure 6. Ces différences sont nettement moins significatives après conservation à 4 °C pendant 14 jours (J14) (F < 50).

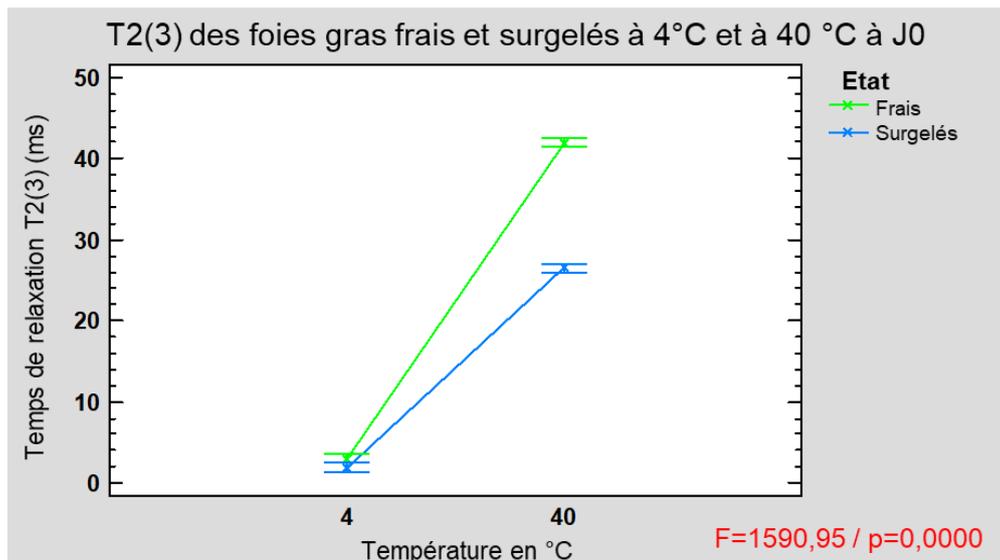


Figure 6 : Tests ANOVA sur les variations de la composante T2(3) des échantillons de FG frais (F) et surgelés/décongelés (S) à J0. En rouge, le facteur F et sa probabilité

En intégrant une variabilité sur la provenance des foies dans nos analyses (Figure 4), les mesures de RMN ont montré que seuls les foies gras surgelés à J0 se distinguaient des 3 autres classes. Cependant la variabilité des échantillons était telle que cette distinction ne nous a pas semblé suffisante.

Les foies gras surgelés à J14 se confondaient avec les foies gras frais, ce qui n'avait pas été observé dans la première partie du projet. Les différences significatives observées lors des mesures à 40°C de la phase 2 ne se sont pas répétées en analysant les foies gras provenant de divers abattoirs. Ces différences ont été attribuées aux différents chemins thermiques subis par les foies gras entre leur prélèvement et leur analyse.

3.3.2 IRM

En ce qui concerne les résultats de la première phase, l'analyse visuelle des images acquises en 3D ne nous a pas permis de détecter de différences entre les foies frais et les congelés/décongelés. En particulier sur les congelés/décongelés, nous n'avons pas observé d'éventuelles craquelures qui auraient pu apparaître lors du processus de surgélation. Ces observations tendent à prouver que la structure macroscopique des foies n'est pas altérée de façon suffisante pour pouvoir être observée à l'échelle millimétrique.

Toujours pour la première phase, la Figure 7 représente les taux de lipides ainsi que la moyenne du signal de l'eau et du signal des lipides pour les foies frais à J0 et J14 et les foies surgelés à J0 et J14, ainsi que leurs moyennes de T2 et de l'amplitude associée.

On observe une variation du taux de lipides mesuré par IRM avec une diminution entre J0 et J14 pour les foies frais et une valeur plus faible pour les foies congelés/décongelés à J0 et J14. Cette diminution est liée à celle du signal des lipides, le signal de l'eau ne variant ni en fonction des jours, ni en fonction de l'histoire thermique. La diminution du signal des lipides est très probablement liée à l'augmentation du pourcentage de matière grasse à l'état cristallisé qui ne donne pas de signal en IRM. Il existerait un phénomène de cristallisation pour les foies frais entre J0 et J14 et, lors de la remontée en température des foies surgelés, il resterait plus de matière grasse cristallisée que dans les foies frais. Ainsi, ce ne serait pas uniquement la température mais l'histoire thermique des foies qui impacterait le taux de cristallisation et par conséquent le taux de lipide mesuré par IRM. Cette hypothèse a été vérifiée par un test de remontée en température à 20 °C (rupture de la chaîne du froid) suivie d'une redescende à 4 °C sur 3 foies surgelés. On a constaté qu'après 6 h à température ambiante le taux de lipide mesuré à 4 °C atteint une valeur typique d'un foie gras frais. La différence observée provient donc très probablement



d'un état différent de la matière grasse qui, pour les foies surgelés, ne s'est pas autant décristallisée que les lipides d'un foie gras frais. Ce phénomène est probablement également à l'origine de la variation de l'amplitude A0 (Figure 7) puisqu'avec ce protocole également la matière grasse cristallisée ne donne pas de signal. En revanche il n'existe pas de variation significative de la valeur moyenne du T2.

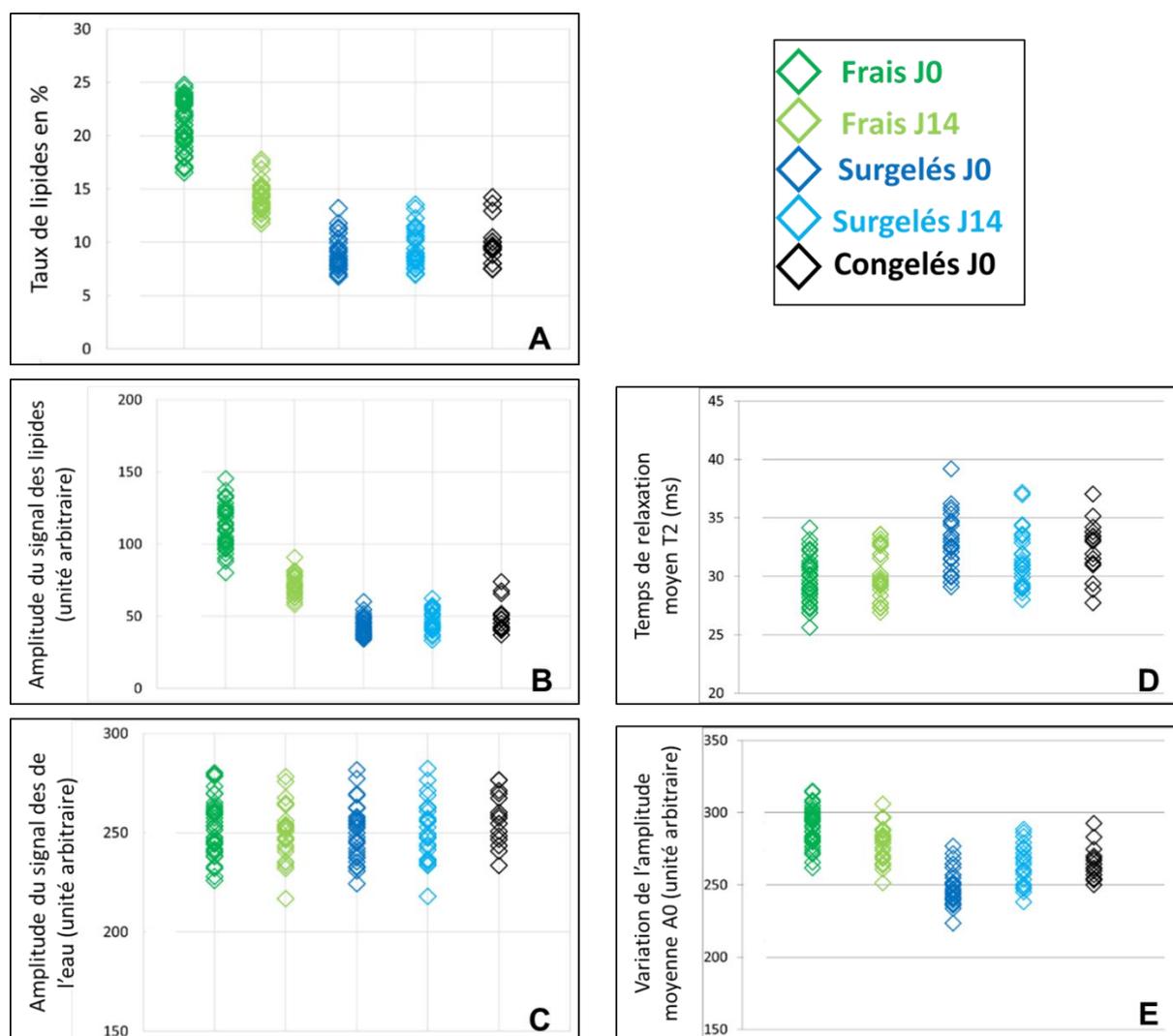


Figure 7 : Taux de lipides (A), signal moyen des lipides (B) et de l'eau (C) ainsi que le temps de relaxation T2 moyen (D) et variation de l'amplitude moyenne (E) sur les foies gras frais et congelés conservés ou non.

Pour la seconde phase, ont été ajoutées des ruptures de la chaîne du froid afin de prendre en compte cette éventualité. On a observé également une baisse du taux de lipides mesurés pour les surgelés à J0, toutefois moins nette que celle observée dans la première phase, une explication peut être une plus grande variabilité de l'origine des foies. De plus, une rupture de la chaîne du froid de 1h a suffi à gommer les différences entre les foies frais et les foies surgelés

4. Conclusion

La détection des foies gras congelés et vendus en frais est un enjeu d'importance pour la filière et mettre au point une méthode de détection fiable et robuste à destination du service des fraudes permettrait d'éviter des pratiques frauduleuses et contribuerait à assurer une plus grande loyauté des transactions commerciales. De fait, ce type de pratique – même si limité en volume - biaise l'équilibre de l'offre et la demande : en créant une disponibilité artificielle sur le marché du foie gras frais de fin d'année et pèse sur la filière avec un manque à gagner estimé *a minima* à 1,2 Millions d'euros. Les méthodes MALDI-TOF



et de NIRS pourraient permettre de répondre à cette demande. En effet, les niveaux de précision atteints pour ces deux méthodes dans le cadre d'une véritable validation externe (site, dates et population différentes) donnent de très bonnes perspectives de développement d'une application pour la détection des foies congelés/décongelés. Il pourrait également être envisagé de réaliser une analyse statistique combinée des 2 méthodes pour gagner en robustesse et en fiabilité. L'enjeu reste malgré tout aujourd'hui de valider ce niveau de performance sur un échantillonnage plus conséquent et représentatif.

La RMN à bas champ, comme l'IRM, est très sensible au taux de cristallisation de la matière grasse qui dépend de l'histoire thermique des foies. Les mesures effectuées sur ce projet ont démontré que, sans maîtrise des chemins thermiques subis par les foies gras sur toute la chaîne de conservation (en abattoir, durant le transport, sur les rayons de magasins, au labo d'analyse en ayant un protocole strict de décongélation), la RMN et l'IRM ne permettent pas de distinguer un foie frais d'un foie congelé/décongelé.

Ethique

Les auteurs déclarent que les expérimentations ont été réalisées en conformité avec les réglementations nationales applicables.

Déclaration sur la disponibilité des données et des modèles

Les données qui étayaient les résultats évoqués dans cet article sont accessibles sur demande auprès de l'auteur de correspondance de l'article.

Déclaration relative à l'Intelligence artificielle générative et aux technologies assistées par l'Intelligence artificielle dans le processus de rédaction.

Les auteurs n'ont pas utilisé de technologies assistées par intelligence artificielle dans le processus de rédaction.

ORCIDs des auteurs

- Marie Bourin (<https://orcid.org/0000-0002-1222-5325>),
- Corinne Rondeau-Mouro (<http://orcid.org/0000-0002-8573-1050>)
- Laëtitia Theron (<https://orcid.org/0000-0003-3879-1496>)

Contributions des auteurs

Tous les auteurs ont contribué à la rédaction de cet article

Déclaration d'intérêt

Les auteurs déclarent ne pas travailler, ne conseiller, ne pas posséder de parts, ne pas recevoir pas de fonds d'une organisation qui pourrait tirer profit de cet article, et ne déclarent aucune autre affiliation que celles citées en début d'article.

Remerciements

Les auteurs remercient les abattoirs pour l'organisation des sessions d'échantillonnage et de prise de mesure ainsi que la DGER via le CASDAR FACADE 2018-2020, et le CIFO (interprofession du foie gras) pour leur soutien financier du projet.

Déclaration de soutien financier

Cette étude a été financée par la DGER via le CASDAR FACADE 2018-2020, et le CIFO.

Références bibliographiques :

Andrés, S., Murray, I., Navajas, E.A., Fisher, A.V., Lambe, N.R., Bünger, L., 2007. Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. *Meat Sci.* 76, 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.011>



- Bastianelli, D., Bonnal, L., Chartrin, P.P., Bernadet, M.-D.M.-D., Marie Etancelin, C., Baéza, E., 2009. Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting lipid content in duck breast meat, in: 19. European Symposium on the Quality of Poultry Meat. 13. European Symposium on the Quality of Eggs and Eggs Products., 19. European Symposium on the Quality of Poultry Meat. 13. European Symposium on the Quality of Eggs and Eggs Products. Turku, Finland.
- Bertram, H.C., Donstrup, S., Karlsson, A.H., Andersen, H.J., 2002. Continuous distribution analysis of T-2 relaxation in meat - an approach in the determination of water-holding capacity. *Meat Sci.* 60, 279–285. <https://doi.org/10/bx5csm>
- Chartrin P., Rousseau X., Gigaud V., Bastianelli D., Baéza E.. 2010. Viandes et Produits Carnés (h.s.) : p. 69-70. Journées des sciences du muscle et technologies des viandes. 13, 2010-10-19/2010-10-20, Clermont-Ferrand (France).
- De Marchi, M., Berzaghi, P., Boukha, A., Mirisola, M., Galol, L., 2007. Use of near infrared spectroscopy for assessment of beef quality traits. *Ital. J. Anim. Sci.* 6, 421–423. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.421>
- Evans, S.D., Nott, K.P., Kshirsagar, A.A., Hall, L.D., 1998. The effect of freezing and thawing on the magnetic resonance imaging parameters of water in beef, lamb and pork meat. *Int. J. Food Sci. Technol.* 33, 317–328. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1998.00165.x>
- Fukushima, E., Roeder, S.B.W., 2018. *Experimental Pulse NMR: A Nuts and Bolts Approach*, 1st ed. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429493867>
- Gaitán-Jurado, A.J., Ortiz-Somovilla, V., España-España, F., Pérez-Aparicio, J., De Pedro-Sanz, E.J., 2008. Quantitative analysis of pork dry-cured sausages to quality control by NIR spectroscopy. *Meat Sci.* 78, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.005>
- Gudjonsdottir, M., Gunnlaugsson, V.N., Finnbogadottir, G.A., Sveinsdottir, K., Magnusson, H., Arason, S., Rustad, T., 2010. Process control of lightly salted wild and farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by brine injection, brining, and freezing--a low field NMR study. *J. Food Sci.* 75, E527-536. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01808.x>
- Hu, H.H., Börnert, P., Hernando, D., Kellman, P., Ma, J., Reeder, S., Sirlin, C., 2012. ISMRM workshop on fat–water separation: Insights, applications and progress in MRI. *Magn. Reson. Med.* 68, 378–388. <https://doi.org/10.1002/mrm.24369>
- Lambelet, P., Renevey, F., Kaabi, C., Raemy, A., 1995. Low-Field Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Study of Stored or Processed Cod. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1462–1466. <https://doi.org/10.1021/jf00054a009>
- Li, J., Xia, K., Li, Y., Tan, M., 2018. Influence of Freezing–Thawing Cycle on Water Dynamics of Turbot Flesh Assessed by Low-Field Nuclear Magnetic Resonance and Magnetic Resonance Imaging. *Int. J. Food Eng.* 14. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2017-0273>
- Liao, Y.-T., Fan, Y.-X., Cheng, F., 2010. On-line prediction of fresh pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Sci.* 86, 901–907. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.07.011>
- Marie-Etancelin, C., Basso, B., Davail, S., Gontier, K., Fernandez, X., Vitezica, Z.G., 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. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3091>
- Meiboom, S., Gill, D., 1958. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.* 29, 688–691. <https://doi.org/10.1063/1.1716296>



- Molette, C., Berzaghi, P., Zotte, A.D., Remignon, H., Babile, R., 2001. The Use of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy in the Prediction of the Chemical Composition of Goose Fatty Liver. *Poult. Sci.* 80, 1625–1629. <https://doi.org/10.1093/ps/80.11.1625>
- Nomura, F., 2015. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.022>
- Nott, K.P., Evans, S.D., Hall, L.D., 1999. Quantitative magnetic resonance imaging of fresh and frozen-thawed trout. *Magn. Reson. Imaging* 17, 445–455. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(98\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(98)00189-1)
- Règlement (UE) n ° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil du 17 décembre 2013 portant organisation commune des marchés des produits agricoles et abrogeant les règlements (CEE) n ° 922/72, (CEE) n ° 234/79, (CE) n ° 1037/2001 et (CE) n ° 1234/2007 du Conseil, 2013. , OJ L.
- Stahl, A., Schröder, U., 2017. Development of a MALDI-TOF MS-Based Protein Fingerprint Database of Common Food Fish Allowing Fast and Reliable Identification of Fraud and Substitution. *J. Agric. Food Chem.* 65, 7519–7527. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02826>
- Théron, L., Sayd, T., Chambon, C., Vautier, A., Ferreira, C., Aubry, L., Ferraro, V., Santé-Lhoutellier, V., 2020. Toward the prediction of PSE-like muscle defect in hams: Using chemometrics for the spectral fingerprinting of plasma. *Food Control* 109, 106929. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106929>
- Thyholt, K., Isaksson, T., 1997. Differentiation of Frozen and Unfrozen Beef Using Near-Infrared Spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.* 73, 525–532. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199704\)73:4<525::AID-JSFA767>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199704)73:4<525::AID-JSFA767>3.0.CO;2-C)
- Tøgersen, G., Isaksson, T., Nilsen, B.N., Bakker, E.A., Hildrum, K.I., 1999. On-line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches. *Meat Sci.* 51, 97–102. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00106-5)
- Uddin, M., Okazaki, E., 2004. Classification of Fresh and Frozen-thawed Fish by Near-infrared Spectroscopy. *J. Food Sci.* 69, C665–C668. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2004.tb18015.x>
- Ulrich, S., Beindorf, P., Biermaier, B., Schwaiger, K., Gareis, M., Gottschalk, C., 2017. A novel approach for the determination of freshness and identity of trouts by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Control* 80, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.005>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue *Innovations Agronomiques* et son DOI, la date de publication.