



HAL
open science

Identification de biomarqueurs plasmatiques et hépatiques de la qualité du foie gras de canard par métabolomique

Zohre Mozduri, Nathalie Marty-Gasset, Bara Lo, Ali Akbar Masoudi, Mireille Morisson, Cécile Canlet, Julien Arroyo, Agnès Bonnet, Cécile Bonnefont

► To cite this version:

Zohre Mozduri, Nathalie Marty-Gasset, Bara Lo, Ali Akbar Masoudi, Mireille Morisson, et al.. Identification de biomarqueurs plasmatiques et hépatiques de la qualité du foie gras de canard par métabolomique. Quatorzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Mar 2022, Tours, France. hal-04806980

HAL Id: hal-04806980

<https://hal.inrae.fr/hal-04806980v1>

Submitted on 27 Nov 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.

IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS PLASMATIQUES ET HÉPATIQUES DE LA QUALITÉ DU FOIE GRAS DE CANARD PAR MÉTABOLOMIQUE

Mozduri Zohre¹, Marty-Gasset Nathalie², Lo Bara², Masoudi Ali Akbar¹, Morisson Mireille², Canlet Cécile³, Arroyo Julien⁴, Bonnet Agnès² et Bonnefont Cécile MD²

¹*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University - TEHRAN, IRAN,*

²*GenPhySE - Université de Toulouse, INRAE, ENVT - 31326 CASTANET-TOLOSAN*

³*Toxalim - Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS - 31027 TOULOUSE*

⁴*ASSELDOR, Station d'expérimentation appliquée et de démonstration sur l'oie et le canard - La Tour de Glane - 24420 COULAURES
cecile.bonnefont@inrae.fr*

RÉSUMÉ

Pour les professionnels de la filière foie gras, les principaux critères de qualité de ce produit sont son poids et son rendement technologique à la cuisson (RTC). Contrairement au poids connu dès l'éviscération du canard, le RTC n'est connu qu'après la cuisson des foies, par pasteurisation ou stérilisation. Or le RTC varie en fonction du poids de foie et du procédé de transformation choisi et impacte la valorisation des produits. Ainsi, l'objectif de l'étude est d'identifier des biomarqueurs corrélés au RTC et qui par conséquent pourraient être utilisés pour prédire le RTC avant la transformation des foies. Pour cela, un lot de 120 canards mulards mâles a été gavé pendant 12 jours (2 fois par jour). Des canards ont été abattus aux jours 6, 8, 10 et 12 (n= 30/abattage) et leur foie a été prélevé. Pour chaque foie, un morceau de 180 g a été mis en verrine afin de déterminer le RTC après pasteurisation et un morceau de 20 g a été congelé. Une heure avant l'abattage, du sang a été prélevé au sinus occipital, et le plasma a été extrait, puis congelé. Des analyses de résonance magnétique du proton (RMN ¹H) ont été réalisées sur les échantillons de plasma et sur les extraits hydrophiles des échantillons de foie. Ces analyses ont permis d'identifier 15 biomarqueurs plasmatiques et 13 biomarqueurs hépatiques du RTC, qui sont principalement des acides aminés et des sucres, dont le lactate. Les biomarqueurs identifiés pourraient permettre de prédire le RTC des foies gras. Ils seraient ainsi d'un intérêt majeur pour les acteurs de la filière. Ces biomarqueurs laissent entrevoir des perspectives intéressantes tant au niveau du pilotage des choix in fine des foies gras à transformer qu'au niveau de la sélection génétique des canards et de l'amélioration de l'alimentation des canards en travaillant sur les additifs alimentaires en vue de diminuer la fonte des foies gras à la cuisson.

ABSTRACT

Identification of plasmatic and hepatic biomarkers of "foie gras" quality in duck by metabolomics

For the professionals of "foie gras" production, the main quality criteria of this product are the liver weight and the technological yield after cooking (TYC). Contrary to the liver weight that is easily known after the duck evisceration, the TYC is only known after cooking the livers by pasteurization or sterilization. However, the TYC depends on the liver weight and on the cooking process and strongly impacts the valorization of the products. Thus, the study aims to identify biomarkers correlated to the TYC and that could predict the TYC before cooking the livers. A group of 120 male mule ducks were overfed during 12 days (twice a day). A subgroup of 30 ducks were slaughtered at day 6, day 8, day 10 and day 12. Their liver was taken off. For each liver a slice of 180 g was sampled and cooked by pasteurization in a glass jar to determine the TYC, and a sample of 20 g was frozen. One hour before the slaughtering, blood was collected at the occipital sinus and the plasma was extracted and frozen. Nuclear Magnetic Resonance of the proton (¹H-NMR) analyses were performed on the plasma samples and on the hydrophilic extracts of the liver. A total of 15 plasmatic biomarkers and 13 hepatic biomarkers of the TYC were identified that are mainly amino acids and carbohydrates. These biomarkers could help to predict the TYC of the "foie gras". Thus, they could be very useful for the "foie gras" producers. The utilization of these biomarkers might be helpful for optimizing the "foie gras" process, for the duck selection and for improving the feed additives in duck nutrition to reduce the melting rate at cooking of "foie gras".

INTRODUCTION

Le foie gras est un produit festif dont la valorisation dépend principalement de l'aspect visuel des foies, de leur poids et de leur rendement technologique à la cuisson (RTC). Contrairement aux deux premiers critères de qualité qui sont facilement mesurables, le RTC n'est déterminé qu'après la cuisson des foies. Ainsi un intérêt primordial pour les acteurs de la filière est d'être capable de prédire le RTC avant la transformation des foies. Des études précédentes ont montré que le RTC est corrélé à la consommation des canards en gavage, au poids de leur foie, à leur teneur en lipides, en protéines et à l'activité de certaines caspases (Marie-Etancelin et al., 2011 ; Théron et al., 2012 ; Réminon et al., 2018 ; Bonnefont et al., 2019).

L'étude présentée ici s'inscrit dans ce contexte en ayant pour objectif d'identifier des biomarqueurs du RTC, *i.e.* des molécules fortement corrélées au RTC. Des biomarqueurs ont été recherchés dans le foie ainsi que dans le plasma car celui-ci représente un fluide disponible de façon peu invasive et qui représente donc des perspectives intéressantes pour l'utilisation des biomarqueurs identifiés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Protocole expérimental et prélèvements

Un lot de 120 canards mulards mâles (Grimaud, lignée H95) a été élevé et gavé à la Station d'Expérimentation appliquée et de démonstration sur l'oie et le canard en 2015 (Coulaures, Dordogne, France) avec l'autorisation d'expérimentation A24-137-1 (Lo et al., 2017). Des groupes de 30 canards ont été abattus tous les 2 jours du 11^e repas (jour 6, J6) jusqu'au 23^e repas (jour 12, J12), après 11 h de jeûne. Après éviscération, un morceau de 180 g de chaque foie a été mis en verrine afin de déterminer le RTC après pasteurisation (valeur de pasteurisation = 170 min) et un morceau de 20 g a été congelé dans de l'azote liquide, puis conservé à -80°C. Une heure avant l'abattage, du sang a été prélevé au sinus occipital, et le plasma a été extrait par centrifugation (à 3 400 g à 4°C, pendant 10 min), avant d'être congelé à -80°C.

Pour caractériser les foies, les teneurs en matière sèche (MS), en lipides totaux (méthode adaptée de Folch et al., 1957) et en matières azotées totales (MAT, réalisée avec un analyseur LECO) ont été mesurées.

1.2. Recherche de biomarqueurs plasmatiques et hépatiques par RMN du proton

Des analyses des foies et des plasmas ont été réalisées par résonance magnétique du proton (RMN-¹H) à la plateforme AXIOM (INRAe, Toulouse). Les méthodes précises sont décrites dans Mozduri et al.

(2021a ; 2021b). Pour les échantillons de foie, les métabolites hydrophiles ont été extraits par une méthode adaptée de Beckonert et al. (2007). Pour les échantillons de plasma, les protéines et les lipides ont été précipités par une méthode adaptée de Nagana Gowda et al. (2015) afin d'extraire les métabolites hydrophiles. Les échantillons ont été préparés dans un solvant D₂O contenant du sodium triméthylsilyl propionate, (TSP), qui est un standard interne ayant un pic à 0 ppm. Les spectres RMN-¹H ont été acquis sur un spectromètre Bruker (Avance III HD, Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Afin d'optimiser les acquisitions des spectres RMN-¹H, deux méthodes ont été utilisées : la méthode NOESYPR1D pour les échantillons de foie et la méthode NOESY pour ceux de plasma.

Après traitement des spectres (transformation de Fourier, phasage, correction de la ligne de base et déplacement du spectre pour calibrer le pic du TSP à 0 ppm), deux méthodes d'analyse des spectres ont été utilisées pour les données plasmatiques et hépatiques :
- une méthode d'analyse en « buckets » avec la plateforme Workflow4Metabolomics 3.3 (Tremblay-Francois et al., 2014) qui consiste à découper le spectre RMN-¹H en petits segments de largeur 0,01 ppm et à intégrer l'aire sous la courbe de ces segments.

- une méthode d'analyse des métabolites présents dans un mélange complexe proposée dans le package ASICS de R (Lefort et al., 2019) qui consiste à considérer le spectre d'un mélange complexe comme la juxtaposition de spectres de métabolites simples présents dans une base de référence de 176 métabolites (Tardivel et al., 2017). Ainsi les données obtenues correspondent à un tableau avec en ligne les individus et en colonne les intensités des métabolites présents dans les échantillons.

Enfin des analyses statistiques multivariées (partial least square PLS) ont été réalisées afin d'identifier les buckets ou les métabolites associés avec le RTC avec le logiciel SIMCA P+ (v12, Umetrics, Umea, Suède). La PLS est une méthode qui permet de représenter des individus (ici les canards) définis par de nombreuses variables (ici 758 buckets ou 43 métabolites selon la méthode d'analyse) dans un espace de dimension réduit, dont les axes sont des combinaisons linéaires des variables initiales et qui permet de maximiser la covariance entre la variable à expliquer (ici le RTC) et les nouveaux axes. En projetant une échelle de couleur correspondant à la variable à expliquer (ici RTC) sur le graphique des individus, on peut facilement identifier les axes qui permettent d'expliquer cette variable. Ensuite on étudie les métabolites dont la contribution à cet axe est importante grâce au critère VIP (variable importance in projection, VIP > 1). Pour valider ces analyses multivariées, des analyses de variance ont été réalisées pour identifier les buckets et les métabolites ayant un effet significatif sur le RTC (P-Valeur corrigée avec la procédure de Benjamini-Hochberg <

0,05) avec le logiciel R (v. version 4.0.2). Les métabolites associés aux buckets significatifs ont été identifiés avec la base de données Human Metabolome Database (Wishart et al., 2009).

Des corrélations de Pearson ont été calculées entre chaque métabolite significatif et le RTC. Pour un métabolite, lorsque les corrélations entre son intensité et le RTC étaient significatives pour les deux méthodes, seuls les résultats de la méthode « métabolite » ont été présentés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'évolution des performances zootechniques des canards au cours du gavage a déjà fait l'objet d'une présentation (Lo et al., 2017). En particulier, le poids de foie a été multiplié par 2,2 entre J6 (343 ± 39 g) et J12 (758 ± 106 g, $P < 0,001$, Fig. 1), alors que le RTC a diminué de $98 \pm 1 \%$ à J6 à $72 \pm 11 \%$ à J12 (Fig. 1).

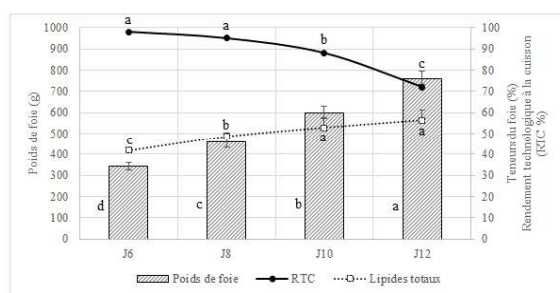


Figure 1. Caractéristiques du foie au cours du gavage (d'après Lo et al., 2017)

Dans cette étude métabolomique, quatre analyses PLS ont été réalisées : deux avec la méthode « buckets » pour les données plasmatiques et hépatiques et deux avec la méthode « métabolites » pour les données plasmatiques et hépatiques. Seul le graphique des individus de la PLS du RTC avec les données hépatiques et la méthode « métabolites » est présenté dans cet article (Fig. 2).

Dans cette étude métabolomique, le premier axe du graphique des individus de la PLS (axe vertical sur la Fig. 2) permet de séparer les animaux en fonction de leur RTC : du rouge pour les individus avec des RTC très élevés jusqu'au vert puis bleu pour des individus avec des RTC plus faibles.

Les métabolites identifiés comme biomarqueurs du RTC dans le plasma et dans le foie sont présentés dans le Tableau 1.

Au total, 17 molécules impliquées dans le métabolisme des acides aminés sont identifiées comme biomarqueurs du RTC. A l'exception de la thréonine hépatique, ils sont tous corrélés positivement avec le RTC (Tab. 1). Le RTC étant corrélé négativement au poids du foie, la quantité d'acides aminés libres est plus élevée dans les foies présentant des poids faibles et des RTC élevés. Ces résultats qui présentent des modifications du métabolisme des acides aminés associées à la stéatose

hépatique ont déjà été montrées chez des canards gavés (Théron et al. 2012, François et al., 2014 ; Lo et al., 2020) et chez d'autres animaux modèles pour la stéatose hépatique comme des souris obèses (Du et al., 2012 ; Bruckbauer et Zemel, 2014).

Les acides aminés libres sont le résultat de l'anabolisme ou du catabolisme des protéines, ainsi leur interprétation n'est pas aisée. Une hypothèse pour expliquer la plus faible quantité d'acides aminés libres dans les foies de poids élevés est que les hépatocytes sont plus gros (Théron et al. 2011), ainsi les acides aminés seraient davantage utilisés pour assurer la synthèse des protéines constitutives des membranes cellulaires et des enzymes impliquées dans la lipogenèse et l'oxydation des acides gras, enzymes dont le turnover au cours du gavage est très important.

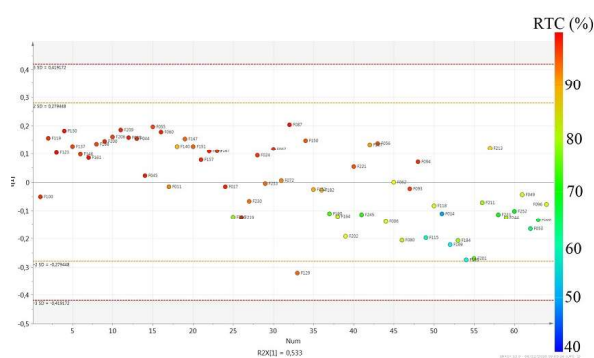


Figure 2. Représentation des individus de la PLS du RTC avec les données hépatiques et la méthode « métabolites »

De plus, six molécules glucidiques sont détectées comme biomarqueurs du RTC. Le lactate est le biomarqueur le plus important (VIP maximal) à la fois dans le plasma et dans le foie. Il est négativement corrélé au RTC, ainsi il est présent en plus grande quantité, quand le RTC diminue. Le lactate avait déjà été identifié comme discriminant dans les foies de deux groupes canards avec des RTC faibles et élevés (Bonnefont et al., 2014). Le lactate dans le plasma et le sang total chez l'homme (Kalhan et al., 2011 ; Lin et al., 2020) et dans le sérum chez la souris (Li et al., 2011) a également déjà été identifié comme biomarqueur positivement corrélé à la stéatose hépatique. L'augmentation du lactate suggère une dégradation accrue du glycogène dans les foies de poids élevés qui réalisent ainsi plus de glycolyse anaérobie. D'après McGarry et al. (2018), dans un environnement hypoxique, on constate une augmentation de l'activité glycolytique associée à une augmentation de la quantité de lactate. Ces résultats suggèrent donc qu'une augmentation du lactate est le signe d'une réorganisation du métabolisme énergétique cellulaire vers la glycolyse anaérobie qui est l'un des signes d'une hypoxie cellulaire. Les foies avec un RTC faible sont plus soumis à ce phénomène d'hypoxie et donc corrélés négativement à la quantité de glycogène et positivement à celle du lactate.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'identifier des biomarqueurs hépatiques et plasmatiques du rendement technologique après la cuisson des foies gras. Des études complémentaires avec de nouveaux animaux sont requises pour vérifier si ces biomarqueurs permettraient de prédire le RTC. Cette étude est une première étape dans la recherche de biomarqueurs

mais d'ores et déjà, elle laisse entrevoir des perspectives intéressantes aussi bien pour pouvoir affiner le choix des foies gras à transformer, que pour d'éventuelles études de sélection génétique de souche de canards ; voire également pour optimiser l'alimentation des canards en travaillant sur des additifs alimentaires protéiques et/ou glucidiques en vue de diminuer la fonte des foies gras à la cuisson.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beckonert et al. 2007. *Protoc.* (2), 2692–2703.
- Bonnefont et al. 2014. *Poult. Sci.* (93) :1542–1552. doi : 10.3382/ps.2013-03546
- Bonnefont et al. 2019. *Poult. Sci.* (0),1–10. doi : 10.3382/ps/pez359
- Bruckbauer et al. 2014. *PLoS One* (9), e89166. doi: 10.1371/journal.pone.0089166
- Du et al. 2012. *Amino Acids* (43), 725–734. doi: 10.1007/s00726-011-1123-8
- Folch et al. 1957. *J. Biol. Chem.* (226), 497–509.
- François et al. 2014. *J. Agric. Food Chem.* (62), 7140–7150. doi: 10.1021/jf5006963
- Kalhan et al. 2011. *Metabolism* (60), 404–413. doi: 10.1016/j.metabol.2010.03.006
- Lefort et al. 2019. *Bioinformatics* (35), 4356–4363. doi: 10.1093/bioinformatics/btz248
- Li et al. 2011. *J. Proteome Res.* (10), 2797–2806. doi: 10.1021/pr200047c
- Lin et al. 2020. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (529), 1101–1105. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.06.126
- Lo et al. 2017. 12^e JRA-FG, 05 et 06 avril 2017
- Lo et al. 2020. *Front. Physiol.* (11), 569329. doi : 10.3389/fphys.2020.569329
- Marie-Etancelin et al. 2011. *J. Anim. Sci.* (89), 669-679. doi: 10.2527/jas.2010-3091
- McGarry, et al. 2018. *Free Radical Biol. and Med.* (125) 15–24. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042
- Mozduri et al. 2021a. *Front. Physiol.* (12), 628264. doi: 10.3389/fphys.2021.628264
- Mozduri et al. 2021b *Front. Physiol.* (12), 694809. doi: 10.3389/fphys.2021.694809
- Nagana Gowda et al. 2015. *Anal. Chem.* (87), 706–715. doi: 10.1021/ac503651e
- Rémignon et al. 2018. *Poult. Sci.* (97), 2211–2217 doi : 10.3382/ps/pey054
- Tardivel et al. 2017. *Metabolomics* (13), 109. doi: 10.1007/s11306-017-1244-5
- Théron et al. 2011. *Meat Sci.* (89), 377-383. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.04.018
- Théron et al. 2012. *J. Anim. Sci.* (90), 3312-3317. doi: 10.2527/jas.2011-4945
- Tremblay-Franco et al. 2014. *Bioinformatics* (31), 1493–1495. doi: 10.1093/bioinformatics/btu813
- Wishart et al. 2009. *Acids Res.* (37), D603–D610. doi: 10.1093/nar/gkn810

Tableau 1. Liste des biomarqueurs plasmatiques et hépatiques du rendement technologique à la cuisson (RTC)

	Biomarqueurs plasmatiques			Biomarqueurs hépatiques		
	Valeur de P	Corrélation avec RTC	Méthode d'analyse ¹	Valeur de P	Corrélation avec RTC	Méthode d'analyse ¹
Acides aminés						
Alanine	0,08	0,85	B et M	< 0,01	0,81	M
Arginine	0,04	0,73	B			
Glutamate				0,01	0,93	B
Glutamine	0,04	0,68	B et M			
Glycine	0,01	0,91	M			
Guanidinoacétate				< 0,01	0,86	M
Isoleucine	< 0,01	0,58	B			
Isosuccinate ^α	< 0,01	0,55	B			
Isovalérate	< 0,01	0,62	B			
Leucine	< 0,01	0,86	M			
Lysine	0,07	0,81	B			
Proline	< 0,01	0,91	M			
Pyroglutamate	< 0,01	0,61	B			
Serine	0,04	0,85	M			
Taurine				< 0,01	0,82	M
Thréonine				< 0,01	-0,95	M
Valine	0,01	0,87	M			
Glucides						
Acide glycérique				< 0,01	0,9	B
Glucose				< 0,01	0,94	B et M
Glycérol	< 0,01	0,83	B			
Glycogène				0,01	0,98	B
Lactate	0,05	-0,42	B et M	< 0,01	-0,97	B et M
Maltose				< 0,01	0,9	B
Autres molécules organiques						
Allantoïne				< 0,01	0,75	B
Créatine				< 0,01	-0,57	B
Ethanolamine				< 0,01	0,95	B

¹ La méthode d'analyse correspond soit à la méthode « Bucket » nommée « B », soit à la méthode « Métabolite » nommée « M ». Lorsqu'un métabolite est identifié par les 2 méthodes, seules les données de la méthode « M » sont présentées.