

# **Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine**

## **II. Influence de la race, de l'âge et du sexe sur leur contenu enzymatique**

par

E. VALLES\* et J. P. FURET\*

### **INTRODUCTION**

Nous avons fait part de la possibilité de l'emploi de préparation de pepsine bovine en fromagerie [9]. Dans un premier article [10] consacré à l'extraction et à l'activation de pepsinogènes bovins à partir de caillettes fraîches, nous avons suggéré que des facteurs tels que la race, l'âge ou le sexe seraient susceptibles d'influencer le contenu enzymatique des caillettes au moment de l'abattage. Le présent travail rend compte de l'étude faite sur cette question à partir de caillettes d'origine parfaitement connue et réalisée grâce à la collaboration du Laboratoire de la production de viande du C.R.Z.V. de l'I.N.R.A. à Theix.

### **1. MATERIEL ET METHODES**

#### **1.1. Animaux**

Nous avons utilisé les caillettes d'animaux qui avaient servi à la réalisation d'expériences relatives à l'engraissement, effectuées par le Laboratoire de production de la viande. Les conditions d'élevage jusqu'à l'abattage, les régimes alimentaires utilisés etc. concernant la plupart des animaux dont les caillettes ont servi à notre travail ont été décrits par Geay *et al.* [3], Muller et Béranger [5].

---

\* Laboratoire de Biochimie et de Technologie Laitières. C.N.R.Z.-I.N.R.A. - 78350 Jouy-en-Josas.

## 1.2. Caillettes

Les caillettes étaient prélevées au moment de l'abattage. Elles étaient retournées, lavées à l'eau, puis placées dans des sacs en matière plastique. Elles étaient ensuite stockées à  $-28^{\circ}\text{C}$  pendant des temps variables, entre 1 à 2 mois environ. Elles étaient transportées congelées à notre laboratoire où elles étaient conservées à  $-28^{\circ}\text{C}$  pendant 5 à 30 j environ avant l'extraction des enzymes.

### 1.2.1. EXTRACTION DES PROTÉASES GASTRIQUES

Avant de procéder à l'extraction des protéases gastriques, les caillettes étaient décongelées à température ambiante (16 à 20 h). Elles étaient pesées et on séparait la graisse et le tissu musculaire de la muqueuse. Les muqueuses étaient pesées et macérées en totalité, selon le procédé décrit par Valles et Furet [10]. Après macération, on prenait une partie aliquote de 500 g de l'extrait brut obtenu et on le clarifiait selon la technique indiquée par Valles et Furet [10]. On relevait le poids de l'extrait clarifié obtenu et on déterminait d'une part son activité coagulante, et d'autre part on préparait un extrait concentré sur une partie aliquote de 250 g, selon le procédé indiqué par Valles et Furet [10]. Les extraits étaient concentrés à une activité coagulante de 4 000 unités (paragraphe 1.3.3.), environ, dissous dans une solution aqueuse de glycérine à 10 p.100, et le pH était ajusté à 5,30. Ces extraits étaient conservés à  $-28^{\circ}\text{C}$  pendant un temps variable, 1 à 2 ans environ.

## 1.3. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante était déterminée par mesure du temps de coagulation à  $35^{\circ}\text{C}$  d'un substrat constitué de 1 p.100 de poudre de lait dans une solution 0,01 M de  $\text{CaCl}_2$  préparée dans un tampon acétate 0,7 M ajusté à pH 5,0.

### 1.3.1. PRÉPARATION DU SUBSTRAT

La préparation du substrat comportait les opérations suivantes :

a) *Préparation de la solution  $\text{CaCl}_2$  0,01 M dans un tampon acétate 0,7 M à pH 5,00*

Dans un bécher de 1 l on pesait 84 g d'acide acétique glacial et 2,2 g de  $\text{CaCl}_2$  anhydre. On ajoutait 800 ml d'eau distillée et on agitait le mélange jusqu'à dissolution. Le bécher était alors placé dans un bain-marie à température ambiante ( $20^{\circ}\text{C}$ ) et on ajustait le pH à 5,00 sous agitation par addition de lessive de soude ( $d = 1,33$ ). On transvasait le contenu du bécher quantitativement dans une fiole jaugée et on complétait le volume à 2 l avec de l'eau distillée.

### b) Préparation du substrat concentré

A 90 g de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M préparée dans du tampon acétate 0,7 M à pH 5,00, on ajoutait 10 g de poudre de lait. On agitait pendant 15 min à l'aide d'un agitateur magnétique. Le substrat ainsi préparé était réparti à raison de 11 ml par tube à vis  $16 \times 110$  mm et les tubes étaient ensuite placés à  $-28^\circ \text{C}$  pendant au moins 16 h avant leur utilisation.

### c) Préparation du substrat utilisé

On décongelait le substrat concentré par immersion des tubes dans un bain-marie à  $35^\circ \text{C}$  pendant 4 min. On homogénéisait le contenu des tubes par retournement et à l'aide d'un agitateur en verre. On ajoutait alors à 270 g de solution de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M en tampon acétate 0,7 M à pH 5,00, 30 g de substrat concentré et 1,5 g d'une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 p. 100. Le mélange était agité à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 15 min. Le substrat était alors réparti dans des tubes à vis  $16 \times 110$  mm à raison de 2 ml avec une seringue Cornwall. Les tubes étaient bouchés et ils étaient placés à  $-28^\circ \text{C}$  lorsque 60 min s'étaient écoulées depuis la fin de la période de 15 min d'agitation indiquée ci-dessus. Le substrat n'était utilisé qu'après au moins 16 h de stockage au congélateur.

## 1.3.2. DÉTERMINATION DU TEMPS DE COAGULATION

Les tubes contenant le substrat congelé étaient retirés du congélateur et aussitôt placés dans un bain-marie réglé à  $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$  pendant 15 min. Ils étaient ensuite utilisés dans les 60 min suivantes. A chaque tube on ajoutait, à l'aide d'une pipette Pedersen, 200  $\mu\text{l}$  de la solution enzymatique et on déclenchait le chronomètre. On bouchait les tubes, on les retournait et on les plaçait sur une planchette oscillante décrite par Douillard et Ribadeau-Dumas [1] dont la période d'oscillation était de 15 s et qui était actionnée par un moteur tournant à la vitesse de 4 tours/min. Dès l'apparition des premiers grumeaux colorés en bleu au sein du liquide de couleur bleu pâle, on arrêtait le chronomètre.

## 1.3.3. UNITÉS D'ACTIVITÉ COAGULANTE

L'activité coagulante est exprimée en unités arbitraires : une unité est définie comme la quantité d'enzyme contenue dans 200  $\mu\text{l}$  de solution qui coagule 2 ml de substrat à  $35^\circ \text{C}$  en 300 s.

L'activité coagulante était déterminée en diluant convenablement les extraits de façon à obtenir un temps de coagulation de  $300 \pm 6$  s. Les dilutions étaient faites par pesée, en ajoutant toujours la solution enzymatique dans le diluant contenu dans des flacons en verre brun. On faisait d'abord une dilution au 1/10, en utilisant comme diluant du tampon acétate 0,7 M à pH 5,00 (sans  $\text{CaCl}_2$ ) et les dilu-

tions suivantes à l'aide d'une solution aqueuse de glycérine à 1 p. 100, contenant 0,1 p. 100 de thymol.

#### 1.3.4. SOLUTIONS ENZYMATIQUES ÉTALON

Afin de contrôler chaque préparation de substrat, on utilisait des solutions enzymatiques étalon, constituées par une dissolution de l'enzyme pure (pepsine A) dans une solution aqueuse de glycérine à 10 p. 100 (p/v). Les solutions enzymatiques étalon étaient conservées à  $-28^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.4. Détermination du contenu enzymatique des extraits

La détermination des quantités de pepsine A, de pepsine B et de chymosine des extraits concentrés était faite par la méthode de Rothe *et al.* [7].

## 2. RESULTATS

### 2.1. Essais préliminaires : détermination de l'activité coagulante

A l'époque où nous avons entrepris ce travail, nous avons envisagé de déterminer pour chaque caillette l'activité coagulante totale et les activités correspondant à la pepsine A et la pepsine B + chymosine, selon la méthode décrite par Garnot *et al.* [2].

Au cours de notre travail, Rothe *et al.* [7] ont fait connaître une méthode permettant le dosage de la pepsine A, de la pepsine B et de la chymosine. Nous avons retenu cette méthode, mais nous avons continué à déterminer l'activité coagulante des extraits à l'aide du substrat que nous avons mis au point, afin de mieux adapter la méthode de Garnot *et al.* à nos conditions de travail. En effet, dans les extraits préparés à partir de caillettes de bovins à l'état ruminant, il fallait s'attendre à trouver de faibles doses de pepsine B et de chymosine, et, par conséquent, à avoir à déterminer des temps de coagulation très longs lors de l'emploi de la méthode de Berridge utilisée dans nos travaux.

Pour pallier cet inconvénient, nous avons essayé de raccourcir le temps de coagulation en utilisant un autre substrat et une température de coagulation plus élevée que celle utilisée dans la méthode de Berridge. Porcher [6] avait montré qu'en diluant le lait et en augmentant en même temps le rapport  $\text{CaCl}_2/\text{lait}$ , le temps de coagulation par la présure diminuait. Gorini et Lanzavecchia [4] utilisèrent un substrat constitué de 1 p. 100 de poudre de lait dans un tampon à pH 5,8. Cisnéros (1975, communication personnelle) avait utilisé un substrat contenant 10 p. 100 de poudre de lait dans un tampon acétate 0,2 M,  $\text{CaCl}_2$  0,01 M à pH 5,40. Nous nous sommes basés

sur ces travaux pour mettre au point le substrat que nous avons retenu.

### 2.1.1. STABILITÉ DU SUBSTRAT

Lors de sa préparation, le substrat n'est pas stable à température ambiante. Le temps de coagulation diminue dans les 4 h qui suivent. Il devient stable après un séjour de 24 h à 3-4° C, ou après 16 h à -28° C. Après décongélation, le substrat est stable à 35° C pendant 2 h.

### 2.1.2. CONSERVATION DU SUBSTRAT ET DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES ÉTALON A -28° C

Nous avons contrôlé la stabilité du substrat et des solutions enzymatiques étalon au cours de leur conservation à -28° C. Par ailleurs, nous avons étudié les variations du temps de coagulation lors de l'emploi de préparations différentes du substrat, à l'aide d'une solution enzymatique étalon. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1.

Ces résultats montrent :

TABLEAU 1

Conservation des substrats et des solutions enzymatiques à -28° C

| Solutions enzymatiques | Durée de conservation (j) | Substrats préparations | Durée de conservation (j) | Temps de coagulation (s) |
|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Pepsine A              | 15                        | B                      | 21                        | 298                      |
|                        | 15                        | C                      | 26                        | 298                      |
|                        | 15                        | D                      | 17                        | 298                      |
|                        | 15                        | E                      | 7                         | 298                      |
|                        | 32                        | B                      | 38                        | 298                      |
|                        | 47                        | A                      | 1                         | 297                      |
|                        | 59                        | A                      | 13                        | 299                      |
|                        | 62                        | C                      | 73                        | 299                      |
|                        | 62                        | D                      | 64                        | 298                      |
|                        | 169                       | E                      | 161                       | 303                      |
|                        | 278                       | F                      | 1                         | 302                      |
|                        | 370                       | G                      | 1                         | 300                      |
|                        | Pepsine B + chymosine     | 1                      | E                         | 3                        |
| 376                    |                           | G                      | 12                        | 470                      |
| Chymosine              | 1                         | E                      | 3                         | 358                      |
|                        | 410                       | G                      | 12                        | 343                      |
| Présure commerciale    | 85                        | I                      | 2                         | 340                      |
|                        | 410                       | E                      | 4                         | 335                      |

— une bonne répétabilité des temps de coagulation obtenus à partir de différentes préparations de substrat ;

— une bonne stabilité du substrat conservé plusieurs mois à  $-28^{\circ}\text{C}$  ;

— une très bonne conservation de la solution étalon de pepsine A et d'une solution de présure commerciale : des écarts inférieurs à 8 p.100 entre les temps de coagulation déterminés au début et à la fin de périodes de conservation de (15-370 j) et (85-410 j) à  $-28^{\circ}\text{C}$  ;

— des résultats moins satisfaisants pendant la conservation dans le cas d'une solution de chymosine et d'une solution de pepsine B + chymosine : des écarts de 7,8 et 4,0 p.100 respectivement ont été observés entre les temps de coagulation avant et après 410 et 376 j de conservation à  $-28^{\circ}\text{C}$ .

Nous avons utilisé, au cours de notre travail, les préparations de substrat ne s'écartant pas de plus de 2 p.100 du temps de coagulation obtenu à l'aide d'une solution enzymatique étalon.

### 2.1.3. RÉDUCTION DU TEMPS DE COAGULATION

Nous avons ajusté une solution de pepsine A et une solution de pepsine B + chymosine (fractions chromatographiques II et I respectivement obtenues par la méthode de Garnot *et al.* à partir d'un extrait coagulant à base de pepsine bovine, de façon à obtenir le même temps de coagulation sur le substrat proposé par Berridge) et nous avons déterminé le temps de coagulation du substrat mis au point par ces solutions ajustées.

Les résultats suivants ont été obtenus :

|                       | Temps de coagulation en secondes              |   |
|-----------------------|---|---|
|                       | Substrat Berridge<br>( $30^{\circ}\text{C}$ ) | Substrat mis au point<br>( $35^{\circ}\text{C}$ ) |
| Pepsine A             | 900   | 60  |
| Pepsine B + chymosine | 900   | 128   |

On constate donc une réduction du temps de coagulation de 15 fois pour la pepsine A et de 7 fois pour la pepsine B + chymosine,

lors de l'emploi de la méthode proposée par rapport à celle de Berridge.

## 2.2. Caillettes de bovins à l'état ruminant

### 2.2.1. ANALYSE STATISTIQUE

Nous avons utilisé des méthodes statistiques classiques comportant l'analyse de variance et la régression [8] et des méthodes simples de classement.

TABLEAU 2

Facteurs de variation et variables étudiées

| Facteurs de variation                         | Variables étudiées  |
|---|---|
| <i>Race</i>                                   | PV : poids vif (kg)   |
| CH : Charolaise                               | PC : poids de la caillette (g)  |
| FF : Frisonne*                                | PM : poids de la muqueuse (g)   |
| HE : Hereford                                 | PE : poids de l'extrait (g)   |
| ME : Montbéliarde                             | AC : activité coagulante<br>(unité AC/g) d'extrait  |
| NO : Normande                                 | PA : pepsine A (mg/kg d'extrait)  |
| LM : Limousine                                | PB : pepsine B (mg/kg d'extrait)  |
| SL : Salers                                   | CHY : chymosine (mg/kg d'extrait)   |
| <i>Sexe</i>                                   | RAC : rendement d'extraction =<br>$AC \times PE/PM$<br>(en unité AC/g de muqueuse)        |
| TR : Taurillons                               | RPA : rendement d'extraction en<br>pepsine A = $PA \times PE/PM$<br>(en mg/kg muqueuse)   |
| BU : Bouvillons                               | RPB : rendement d'extraction en<br>pepsine B = $PB \times PE/PM$<br>(en mg/kg muqueuse)   |
| GE : Génisses                                 | RCHY : rendement d'extraction en<br>chymosine = $CHY \times PE/PM$<br>(en mg/kg muqueuse) |
| VR : Vaches de réforme                        |   |
| <i>Régime alimentaire</i>                     |   |
| R1 : ensilage de maïs + concentré             |   |
| R2 : foin + concentré                         |   |
| R3 : foin + concentré + pulpe de<br>betterave |   |
| <i>Age</i>                                    |   |
| 15, 16, 18, 19, 20, 22 et 24 mois             |   |
| vaches de réforme : 48 à 120 mois             |   |
| * Française Frisonne Pie Noire                |   |

#### Notation statistique utilisée

$\bar{x}$  = moyenne

s = écart-type

n = effectif

CV = coefficient de variation =  $100 s/\bar{x}$

\* = différence significative. Seuil P = 0,05

\*\* = différence significative. Seuil P. = 0,01

pop = population

### *Analyse de variance*

Nous avons premièrement procédé à la constitution de 16 populations de caillettes, caractérisées par la *race*, le *sexe* et le *régime alimentaire* des animaux sur lesquels elles avaient été prélevées.

Deuxièmement, nous avons choisi un certain nombre de variables intéressant d'une part, l'étude du contenu enzymatique des caillettes, et d'autre part la préparation d'extraits coagulants. L'ensemble de ces variables est décrit dans le tableau 2. Nous distinguons parmi ces variables, celles qui ont été *mesurées* que nous avons classées en deux groupes :

1. Les variables *relatives à l'animal* : le poids vif, le poids de la caillette entière et le poids de la muqueuse.

2. Les variables *relatives à l'extrait* (obtenu à partir de la muqueuse) : le poids de l'extrait, l'activité coagulante, le taux de pepsines A et B et le taux de chymosine.

Nous distinguons enfin les *variables calculées* : ce sont celles correspondant aux rendements d'extraction, exprimées en activité coagulante, en pepsine A et B et en chymosine, définies dans le tableau 2.

Nous avons étudié l'influence des facteurs de variation suivants : *la race*, *le sexe* et *l'âge*. Le régime alimentaire n'a pu être étudié faute d'échantillons de caillettes appropriés. Cette étude a été faite par analyse de variance, et dans ce but, nous avons fait 9 plans d'analyse comportant, d'autre part 2 plans à 2 facteurs (*race* et *sexe*) [plans 1 et 2] et, d'autre part 7 plans d'analyse de variance à un facteur (*race*, *sexe* ou *âge*) [plans 3 et 9].

Ces 9 plans correspondaient à l'ensemble des comparaisons possibles faites à partir de la totalité des caillettes dont nous disposions. Les résultats de l'analyse de variance sont indiqués sous forme résumée dans le tableau 3. Dans ce tableau, nous présentons la signification des résultats obtenus pour chaque variable, sous l'influence de chaque facteur de variation étudié dans les 9 plans d'analyse de variance.

#### *2.2.1.1. Facteurs de variation susceptibles d'influencer le contenu enzymatique des caillettes.*

Nous avons étudié l'influence de la *race*, du *sexe* et de l'*âge* sur l'ensemble des variables décrites. Dans les tableaux 4 à 12 nous décrivons les plans d'analyse de variance utilisés, et en même temps les valeurs moyennes des variables obtenues, ainsi que les résultats significatifs observés.

#### *2.2.1.2. Régression entre le poids de la muqueuse et le poids de l'extrait clarifié*

Nous avons montré [10] une corrélation significative entre le poids de la muqueuse et le poids de l'extrait clarifié lors de la préparation d'extraits coagulants à partir de caillettes fraîches.

TABLEAU 3

Signification de l'influence de la race, du sexe et de l'âge sur les variables relatives aux protéases gastriques

| Plan<br>n° | Facteurs de variation<br>étudiés | Variables mesurées<br>relatives à l'animal |    |    | Variables mesurées<br>relatives à l'extrait |    |    |               |     | Variables calculées |     |              |      |
|------------|----------------------------------|--|----|----|---|----|----|---------------|-----|---------------------|-----|--------------|------|
|            |                                  | PV   | PC | PM | PE  | AC | PA | PB            | CHY | RAC                 | RPA | RPB          | RCHY |
| 1          | Race<br>Sexe<br>Int. race/sexe   | *  | *  |    | *   | ** | ** | **<br>*<br>** |     | **                  | **  | **<br><br>** |      |
| 2          | Race<br>Sexe<br>Int. race/sexe   | **   |    | *  | *<br>*                                      | *  | *  | *<br>*        |     | **                  |     |              |      |
| 3          | Race                             |  |    |    |   | ** |    |               |     | **                  |     |              |      |
| 4          | Race                             |  |    |    |   | *  | *  |               |     | *                   | *   |              |      |
| 5          | Race                             | *  | ** | ** | **  | *  |    |               |     | **                  |     |              |      |
| 6          | Sexe                             | **   |    | ** | *   | *  |    | *             |     |                     |     |              |      |
| 7          | Age                              | **   |    |    |   | ** |    | **            |     | **                  |     | **           |      |
| 8          | Age                              |  |    |    |   |    |    | **            |     |                     |     | **           |      |
| 9          | Age                              | **   | ** | *  | *   | *  |    |               | **  | **                  |     |              |      |

Note : int. = interaction.

TABLEAU 4

Influence de la race et du sexe

Analyse de variance

Facteurs fixés

Age : 24 mois

Régime : R1

| Plan n°    | Facteurs de variation étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |       |       |                       |       |     |     |       | Variables calculées |     |     |      |  |
|------------|-------------------------------|-----------|----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-----|-----|-------|---------------------|-----|-----|------|--|
|            |                               |           | Relatives à l'animal |       |       | Relatives à l'extrait |       |     |     |       | RAC                 | RPA | RPB | RCHY |  |
|            |                               |           | PV                   | PC    | PM    | PE                    | AC    | PA  | PB  | CHY   |                     |     |     |      |  |
| 1          | <i>Race :</i>                 |           |                      |       |       |                       |       |     |     |       |                     |     |     |      |  |
|            | Normande (20 TR) (7 BU)       | 27        | 653                  | 2 489 | 698   | 1 015                 | 1 319 | 617 | 40  | 21    | 1 922               | 863 | 59  | 31   |  |
|            | Limousine (9 TR) (9 BU)       | 18        | 609                  | 2 097 | 751   | 1 188                 | 910   | 388 | 15  | 15    | 1 387               | 618 | 39  | 23   |  |
|            |                               |           | *                    | **    |       | *                     | **    | **  | **  |       | **                  | **  | **  |      |  |
|            | <i>et sexe :</i>              |           |                      |       |       |                       |       |     |     |       |                     |     |     |      |  |
|            | Taurillons                    | 29        | 852                  | 2 345 | 718   | 1 082                 | 1 172 | 536 | 23  | 19    | 1 729               | 777 | 37  | 29   |  |
| Bouvillons | 16                            | 604       | 2 309                | 721   | 1 087 | 1 126                 | 507   | 54  | 18  | 1 669 | 743                 | 77  | 26  |      |  |
|            |                               |           | *                    |       |       |                       |       | **  | I** |       |                     | **  | I** |      |  |

EFFET DE LA RACE

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS

I = interaction race/sexe

*Variables mesurées*

Activité coagulante (AC) Normande>Limousine  
 Pepsine A (PA) Normande>Limousine  
 Pepsine B (PB) Normande>Limousine  
 Interaction race/sexe : pepsine B (PB) Normande>Limousine  
 Poids de la caillotte (PC) Normande>Limousine  
 Poids de l'extrait (PE) Limousine>Normande  
 Poids vif (PV) Normande>Limousine

*Variables calculées*

Rendement activité coagulante (RAC) Normande>Limousine  
 Rendement pepsine A (RPA) Normande>Limousine  
 Rendement pepsine B (RPB) Normande>Limousine  
 Interaction race/sexe : rendement pepsine B (RPB)

EFFET DU SEXE

*Variables mesurées*

Poids vif (PV) Taurillons>bouvillons  
 Pepsine B (PB) Bouvillons>taurillons

TABLEAU 5

Influence de la race et du sexe

Analyse de variance

Facteurs fixés

Age : 24 mois

Régime : R1

| Plan n°  | Facteurs de variation étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |       |     |                       |       |     |     |       | Variables calculées |     |     |      |
|----------|-------------------------------|-----------|----------------------|-------|-----|-----------------------|-------|-----|-----|-------|---------------------|-----|-----|------|
|          |                               |           | Relatives à l'animal |       |     | Relatives à l'extrait |       |     |     |       |                     |     |     |      |
|          |                               |           | PV                   | PC    | PM  | PE                    | AC    | PA  | PB  | CHY   | RAC                 | RPA | RPB | RCHY |
| 2        | <i>Race :</i>                 |           |                      |       |     |                       |       |     |     |       |                     |     |     |      |
|          | Charolaïse (15 TR) (7 GE)     | 22        | 583                  | 2 171 | 684 | 1 085                 | 1 124 | 576 | 18  | 24    | 1 783               | 906 | 29  | 36   |
|          | Limousine (9 TR) (9 GE)       | 18        | 564                  | 1 949 | 632 | 940                   | 960   | 457 | 28  | 23    | 1 327               | 681 | 39  | 33   |
|          |                               |           |                      |       |     |                       | *     |     | *   |       | **                  |     |     |      |
|          | <i>et sexe :</i>              |           |                      |       |     |                       |       |     |     |       |                     |     |     |      |
|          | Taurillons                    | 24        | 634                  | 2 119 | 703 | 1 131                 | 1 014 | 548 | 21  | 24    | 1 608               | 890 | 36  | 38   |
| Génisses | 16                            | 485       | 2 000                | 596   | 852 | 1 105                 | 484   | 25  | 23  | 1 531 | 677                 | 30  | 30  |      |
|          |                               |           | **                   |       | I*  | *                     | I**   | I** | I** |       | I**                 |     |     |      |

EFFET DE LA RACE

I = interaction race/sexe

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS

*Variables mesurées*

Activité coagulante (AC)

Pepsine B (PB)

Interaction race/sexe : pepsine A (PA)

Interaction race/sexe : pepsine B (PB)

Interaction race/sexe : poids de muqueuse (PM)

Interaction race/sexe : poids de l'extrait (PE)

*Variables calculées*

Rendement activité coagulante (RAC) Charolaïse&gt;Limousine

Charolaïse&gt;Limousine

Limousine&gt;Charolaïse

EFFET DU SEXE

*Variables mesurées*

Poids de l'extrait (PE)

Poids vif (PV)

Taurillons&gt;génisses

Taurillons&gt;génisses

TABLEAU 6  
Influence de la race

*Analyse de variance*

*Facteurs fixés*

Age : 24 mois

Sexe : taurillons

Régime : R1

| Plan n° | Facteurs de variation étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |       |     |                       |           |     |    |     | Variables calculées |       |     |      |
|---------|-------------------------------|-----------|----------------------|-------|-----|-----------------------|-----------|-----|----|-----|---------------------|-------|-----|------|
|         |                               |           | Relatives à l'animal |       |     | Relatives à l'extrait |           |     |    |     | RAC                 | RPA   | RPB | RCHY |
|         |                               |           | PV                   | PC    | PM  | PE                    | AC        | PA  | PB | CHY |                     |       |     |      |
| 3       | Race : Normande               | 20        | 668                  | 2 463 | 703 | 1 025                 | 1 329     | 604 | 25 | 19  | 1 943               | 834   | 37  | 29   |
|         | Charolaise                    | 15        | 646                  | 2 141 | 674 | 1 085                 | 1 128     | 646 | 22 | 28  | 1 820               | 1 035 | 36  | 43   |
|         | Limousine                     | 9         | 616                  | 2 083 | 753 | 1 209                 | 823<br>** | 384 | 19 | 18  | 1 255<br>**         | 650   | 37  | 29   |

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS

*Variables mesurées*

Activité coagulante (AC)

Normande > Charolaise > Limousine

*Variables calculées*

Rendement activité coagulante (RAC)

Normande > Charolaise > Limousine

TABLEAU 7

Analyse de variance

Facteurs fixés

Age : 16 mois

Régime : R1

Sexe : taurillons

| Plan<br>n° | Facteurs de variation<br>étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |       |     |                       |          |          |    |     | Variables calculées |          |     |      |
|------------|----------------------------------|-----------|----------------------|-------|-----|-----------------------|----------|----------|----|-----|---------------------|----------|-----|------|
|            |                                  |           | Relatives à l'animal |       |     | Relatives à l'extrait |          |          |    |     | RAC                 | RPA      | RPB | RCHY |
|            |                                  |           | PV                   | PC    | PM  | PE                    | AC       | PA       | PB | CHY |                     |          |     |      |
| 4          | Race : Frisonne                  | 5         | 522                  | 1 978 | 553 | 853                   | 1 446    | 1 061    | 26 | 57  | 2 210               | 1 659    | 45  | 84   |
|            | Salers                           | 8         | 524                  | 2 125 | 590 | 1 000                 | 910<br>* | 359<br>* | 9  | 65  | 1 528<br>*          | 602<br>* | 15  | 109  |

## RÉSULTATS SIGNIFICATIFS

*Variables mesurées*

Activité coagulante (AC)  
Pepsine A (PA)

Frisonne > Salers  
Frisonne > Salers

*Variables calculées*

Rendement activité coagulante (RAC)  
Rendement pepsine A (RPA)

Frisonne > Salers  
Frisonne > Salers

TABLEAU 8  
Influence de la race

Analyse de variance

Facteurs fixés

Age : 19 mois

Sexe : bouvillons

Régime : divers

| Plan n° | Facteurs de variation étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |             |           |                       |            |     |    |     | Variables calculées |     |     |      |
|---------|-------------------------------|-----------|----------------------|-------------|-----------|-----------------------|------------|-----|----|-----|---------------------|-----|-----|------|
|         |                               |           | Relatives à l'animal |             |           | Relatives à l'extrait |            |     |    |     | RAC                 | RPA | RPB | RCHY |
|         |                               |           | PV                   | PC          | PM        | PE                    | AC         | PA  | PB | CHY |                     |     |     |      |
| 5       | Race : Charolaise             | 6         | 577                  | 1 680       | 385       | 600                   | 1 371      | 580 | 33 | 49  | 2 041               | 886 | 53  | 71   |
|         | Normande                      | 7         | 532<br>*             | 2 245<br>** | 772<br>** | 1 122<br>**           | 1 018<br>* | 468 | 24 | 24  | 1 469<br>**         | 677 | 36  | 33   |

FACTEURS SIGNIFICATIFS

*Variables mesurées*

Activité coagulante (AC)  
Poids de la caillette (PC)  
Poids de la muqueuse (PM)  
Poids de l'extrait (PE)  
Poids vif (PV)

Charolaise > Normande  
Normande > Charolaise  
Normande > Charolaise  
Normande > Charolaise  
Charolaise > Normande

*Variables calculées*

Rendement activité coagulante (RAC) Charolaise > Normande

TABLEAU 9  
Influence du sexe

Analyse de variance

Facteurs fixés

Race : Limousine

Age : 24 mois

Régime : R1

| Plan n° | Facteurs de variation étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |       |           |                       |            |     |         |     | Variables calculées |     |     |      |
|---------|-------------------------------|-----------|----------------------|-------|-----------|-----------------------|------------|-----|---------|-----|---------------------|-----|-----|------|
|         |                               |           | Relatives à l'animal |       |           | Relatives à l'extrait |            |     |         |     | RAC                 | RPA | RPB | RCGT |
|         |                               |           | PV                   | PC    | PM        | PE                    | AC         | PA  | PB      | CHY |                     |     |     |      |
| 6       | Sexe : Taurillons             | 9         | 616                  | 2 083 | 753       | 1 029                 | 823        | 384 | 19      | 18  | 1 255               | 650 | 37  | 29   |
|         | Bouvillons                    | 9         | 601                  | 2 112 | 750       | 1 167                 | 999        | 392 | 30      | 12  | 1 519               | 586 | 42  | 18   |
|         | Génisses                      | 9         | 512<br>**            | 1 816 | 510<br>** | 672<br>*              | 1 097<br>* | 529 | 38<br>* | 28  | 1 440               | 711 | 45  | 37   |

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS

Variables mesurées

Activité coagulante (AC)

Pepsine B (PB)

Poids de la muqueuse (PM)

Poids de l'extrait (PE)

Poids vif (PV)

Génisses > Bouvillons > Taurillons

Génisses > Bouvillons > Taurillons

Taurillons > Bouvillons > Génisses

Bouvillons > Taurillons > Génisses

Taurillons > Bouvillons > Génisses

TABLEAU 10  
Influence de l'âge

Analyse de variance

Facteurs fixés

Race : Normande

Sexe : taurillons

Régime : R1

| Plan n° | Facteurs de variation étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |       |     |                       |           |     |          |     | Variables calculées |     |         |      |
|---------|-------------------------------|-----------|----------------------|-------|-----|-----------------------|-----------|-----|----------|-----|---------------------|-----|---------|------|
|         |                               |           | Relatives à l'animal |       |     | Relatives à l'extrait |           |     |          |     | RAC                 | RPA | RPB     | RCHY |
|         |                               |           | PV                   | PC    | PM  | PE                    | AC        | PA  | PB       | CHY |                     |     |         |      |
| 7       | Age : 24 mois                 | 20        | 668                  | 2 463 | 703 | 1 025                 | 1 329     | 604 | 25       | 19  | 1 943               | 834 | 37      | 29   |
|         | 20 mois                       | 10        | 573<br>**            | 2 220 | 624 | 938                   | 891<br>** | 480 | 49<br>** | 23  | 1 339<br>**         | 728 | 72<br>* | 35   |

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS

*Variables mesurées*

Activité coagulante (AC)  
Pepsine B (PB)  
Poids vif (PV)

24 mois > 20 mois  
20 mois > 24 mois  
24 mois > 20 mois

*Variables calculées*

Rendement activité coagulante (RAC)  
Rendement pepsine B (RPB)

24 mois > 20 mois  
20 mois > 24 mois

TABLEAU 11  
Influence de l'âge

Analyse de variance

Facteurs fixés

Race : Normande

Sexe : bouillons

Régime : R1

| Plan n° | Facteurs de variation étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |       |     |                       |       |     |          |     | Variables calculées |       |          |      |
|---------|-------------------------------|-----------|----------------------|-------|-----|-----------------------|-------|-----|----------|-----|---------------------|-------|----------|------|
|         |                               |           | Relatives à l'animal |       |     | Relatives à l'extrait |       |     |          |     | RAC                 | RPA   | RPB      | RCHY |
|         |                               |           | PV                   | PC    | PM  | PE                    | AC    | PA  | PB       | CHY |                     |       |          |      |
| 8       | Age : 24 mois                 | 7         | 609                  | 2 563 | 684 | 986                   | 1 290 | 654 | 85       | 26  | 1 861               | 945   | 122      | 37   |
|         | 22 mois                       | 12        | 637                  | 2 723 | 708 | 1 037                 | 1 107 | 798 | 35<br>** | 28  | 1 619               | 1 165 | 51<br>** | 41   |

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS

Variables mesurées  
Pepsine B (PB)

24 mois > 22 mois

Variables calculées  
Rendement pepsine B (RPB)

24 mois > 22 mois

TABLEAU 12

Influence de l'âge

Analyse de variance

Facteurs fixés

Race : Frisonne

Régime : divers

Age : « jeunes animaux » (16-18 mois)

« vaches de réforme » (69 mois, âge moyen)

| Plan n° | Facteurs de variation étudiés | Effectifs | Variables mesurées   |            |          |                       |          |     |    |          | Variables calculées |       |     |      |
|---------|-------------------------------|-----------|----------------------|------------|----------|-----------------------|----------|-----|----|----------|---------------------|-------|-----|------|
|         |                               |           | Relatives à l'animal |            |          | Relatives à l'extrait |          |     |    |          | RAC                 | RPA   | RPB | RCHY |
|         |                               |           | PV                   | PC         | PM       | PE                    | AC       | PA  | PB | CHY      |                     |       |     |      |
| 9       | Age :                         |           |                      |            |          |                       |          |     |    |          |                     |       |     |      |
|         | « jeunes animaux »            | 14        | 500                  | 2 083      | 504      | 749                   | 1 315    | 931 | 24 | 48       | 1 963               | 1 405 | 38  | 71   |
|         | « vaches de réforme »         | 12        | 588                  | 2 679<br>* | 852<br>* | 1 244<br>*            | 917<br>* | 675 | 76 | 13<br>** | 1 351<br>*          | 912   | 67  | 19   |

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS

Variables mesurées

Activité coagulante (AC) « J. animaux » > vaches réforme  
 Chymosine (CHY) « J. animaux » > vaches réforme  
 Poids de la caillette (PC) vaches réforme > « J. animaux »  
 Poids de la muqueuse (PM) vaches réforme > « J. animaux »  
 Poids de l'extrait (PE) vaches réforme > « J. animaux »  
 Poids vif (PV) vaches réforme > « J. animaux »

Variables calculées

Rendement activité coagulante (RAC) « J. animaux » > vaches réforme

Dans le but de vérifier cette constatation, et de voir, en outre, s'il y avait des différences significatives entre les équations de régression établies à partir de caillettes de différentes origines, nous avons calculé les équations de régression suivantes :

1. Race : Salers (taurillons)  
 $PE_1 = 1,85 PM - 102$   $r_1 = 0,994^{**}$  (n = 8).
2. Race : Normande (bouvillons)  
 $PE_2 = 1,49 PM + 32$   $r_2 = 0,851^*$  (n = 7).
3. Race : Limousine (génisses)  
 $PE_3 = 1,03 PM + 147$   $r_3 = 0,785^*$  (n = 9).
4. Race : Limousine (bouvillons)  
 $PE_4 = 2,33 PM + 585$   $r_4 = 0,997^{**}$  (n = 9).

Les coefficients de corrélation ( $r_1$  et  $r_2$ ), ( $r_1$  et  $r_3$ ) et ( $r_3$  et  $r_4$ ) sont significativement différents ( $P = 0,05$ ).

#### 2.1.2.3. Régression entre l'activité coagulante et la concentration en protéases gastriques

Nous avons étudié la régression entre l'activité coagulante et le contenu en pepsine A, en pepsine B et en chymosine. Il s'agissait d'une part, de déterminer l'équation de régression entre l'activité coagulante et ces trois protéases gastriques, et d'autre part d'expliquer l'importance relative de leur rôle sur l'activité coagulante. Ce calcul, qui comportait une régression multiple entre ces quatre variables, a été réalisé à l'aide du programme « Régression Multiple Progressive », de la Station de Biométrie du C.N.R.Z. Il a été exécuté à partir des données correspondant aux caillettes d'animaux de race Limousine utilisées dans le plan n° 6 de l'analyse de variance.

a) *Equation de régression entre l'activité coagulante et les trois protéases gastriques :*

$$AC = 1,47 PA + 3,21 PB - 1,84 CHY + 207,67.$$

$$r = 0,851^{**}.$$

b) La pepsine A (PA) est la *principale variable explicative* de l'activité coagulante, et l'équation de régression précédente peut être remplacée par celle-ci :

$$AC = 1,45 PA + 272,72.$$

$$r = 0,833^{**}.$$

#### 2.1.2.4. Caractéristiques des caillettes à utiliser pour l'obtention d'extraits coagulants

Dans la préparation d'extraits coagulants, il faut tenir compte du poids de matière première mise en œuvre et du rendement d'extraction (quantité d'enzymes récupérée par unité de poids de matière première).

### A. Matière première

Bien que la caillette constitue la matière première pour l'obtention d'extraits coagulants, il y a lieu de distinguer la partie fundique, très riche en cellules sécrétrices et en enzymes, et la partie pylorique qui en est assez dépourvue. Par ailleurs, dans le cas du poids d'une caillette entière, il faut tenir compte du poids de la muqueuse, du poids de tissu musculaire et du poids de graisse. Pour la préparation d'extraits coagulants, on opère en général à partir de caillettes dégraissées (muqueuse + tissu musculaire) auxquelles on a enlevé la partie pylorique.

Dans le but de caractériser les valeurs moyennes de ces différents paramètres, nous avons calculé, à partir d'un lot de 135 caillettes d'animaux âgés de 15 à 24 mois, de races différentes, et d'un lot de 21 caillettes de vaches de réforme, les valeurs suivantes :

|  | Animaux 15-24 mois |     | Vaches de réforme |     |
|--|--------------------|-----|-------------------|-----|
|  | $\bar{x}$          | s   | $\bar{x}$         | s   |
| Poids de la caillette entière (en g)                             | 2 056              | 503 | 3 268             | 743 |
| Poids de la caillette dégraissée sans la partie pylorique (en g) | 856                | 242 | 1 596             | 486 |
| Poids de la muqueuse (en g)                                      | 548                | 178 | 1 223             | 435 |

### B. Rendement d'extraction

Ce paramètre permet d'estimer les quantités d'enzymes récupérées à partir d'un poids donné de matière première mise en œuvre. Dans ce travail, nous l'avons calculé à partir du poids de la muqueuse. Nous avons déterminé d'une part, le rendement d'extraction en unités d'activité coagulante pour 1 g de muqueuse (RAC) et, d'autre part le rendement en mg de pepsine A (RPA), de pepsine B (RPB) et de chymosine (RCHY) par kg de muqueuse. Le mode de calcul de ces rendements est indiqué dans le tableau 2.

Nous avons utilisé deux rendements d'extraction, (RAC) et (RPA), pour établir un classement des caillettes en vue de leur utilisation pour la préparation d'extraits coagulants.

Dans ce but, nous avons employé les 16 populations de caillettes qui ont servi pour l'analyse de variance et des populations nouvelles qui n'ont pas pu être utilisées dans cette analyse, constituant ainsi un ensemble de 174 caillettes. Nous avons regroupé ces caillettes en trois tranches d'âge : 15-18, 19-22 et 24 mois. Nous avons obtenu les 18 populations décrites dans le tableau 13 que nous avons classées

TABLEAU 13

Classement des caillettes en fonction de leur activité coagulante et leur contenu en pepsine A de la muqueuse

| Rang | n°  | Population      | Activité coagulante (RAC)<br>(unités AC/g muqueuse) |       |    |    | n°  | Population      | Pepsine A (RPA)<br>(mg/kg muqueuse) |       |    |    |
|------|-----|-----------------|---|-------|----|----|-----|-----------------|-------------------------------------|-------|----|----|
|      |     |                 | $\bar{x}$   | s     | n  | CV |     |                 | $\bar{x}$                           | s     | n  | CV |
| 1    | 13b | FF TR 15 - 18 m | 2 250   | 581   | 11 | 26 | 17  | ME TR 15 - 18 m | 2 235                               | 1 118 | 7  | 50 |
| 2    | 17  | ME TR 15 - 18 m | 2 213   | 1 008 | 7  | 46 | 13b | FF TR 15 - 18 m | 1 950                               | 611   | 11 | 31 |
| 3    | 7   | CH BU 19 - 22 m | 2 040   | 162   | 6  | 8  | 19  | CH TR 15 - 18 m | 1 821                               | 934   | 7  | 51 |
| 4    | 1   | NO TR 24 m      | 1 943   | 489   | 20 | 25 | 14  | FF BU 15 - 18 m | 1 192                               | 1 093 | 6  | 92 |
| 5    | 3   | NO BU 24 m      | 1 864   | 147   | 7  | 8  | 6   | CH TR 24 m      | 1 035                               | 411   | 15 | 40 |
| 6    | 6   | CH TR 24 m      | 1 820   | 488   | 15 | 27 | 45  | NO BU 19 - 22 m | 985                                 | 517   | 19 | 52 |
| 7    | 8   | CH GE 24 m      | 1 703   | 245   | 7  | 14 | 3   | NO BU 24 m      | 945                                 | 97    | 7  | 10 |
| 8    | 14  | FF BU 19 - 22 m | 1 634   | 720   | 6  | 44 | 16  | FF VR 69 m      | 912                                 | 497   | 12 | 54 |
| 9    | 45  | NO BU 19 - 22 m | 1 564   | 378   | 19 | 24 | 7   | CH BU 19 - 22 m | 886                                 | 322   | 6  | 36 |
| 10   | 12  | SL TR 15 - 18 m | 1 528   | 290   | 8  | 19 | 1   | NO TR 24 m      | 834                                 | 330   | 20 | 40 |
| 11   | 10  | LM BU 24 m      | 1 519   | 281   | 9  | 18 | 2   | NO TR 19 - 22 m | 728                                 | 275   | 10 | 38 |
| 12   | 11  | LM GE 24 m      | 1 440   | 349   | 9  | 24 | 11  | LM GE 24 m      | 711                                 | 193   | 9  | 27 |
| 13   | 19  | CH TR 15 - 18 m | 1 437   | 704   | 7  | 49 | 9   | LM TR 24 m      | 650                                 | 262   | 9  | 40 |
| 14   | 16  | FF VR 69 m      | 1 351   | 512   | 12 | 38 | 8   | CH GE 24 m      | 632                                 | 272   | 7  | 43 |
| 15   | 2   | NO TR 19 - 22 m | 1 339   | 371   | 10 | 28 | 18  | HE TR 15 - 18 m | 626                                 | 378   | 7  | 60 |
| 16   | 18  | HE TR 15 - 18 m | 1 305   | 497   | 7  | 38 | 12  | SL TR 15 - 18 m | 602                                 | 97    | 5  | 16 |
| 17   | 9   | LM TR 24 m      | 1 255   | 351   | 9  | 28 | 10  | LM BU 24 m      | 586                                 | 187   | 9  | 32 |
| 18   | 20  | CH VR 106 m     | 925   | 456   | 5  | 49 | —   | — — —           | —                                   | —     | —  | —  |

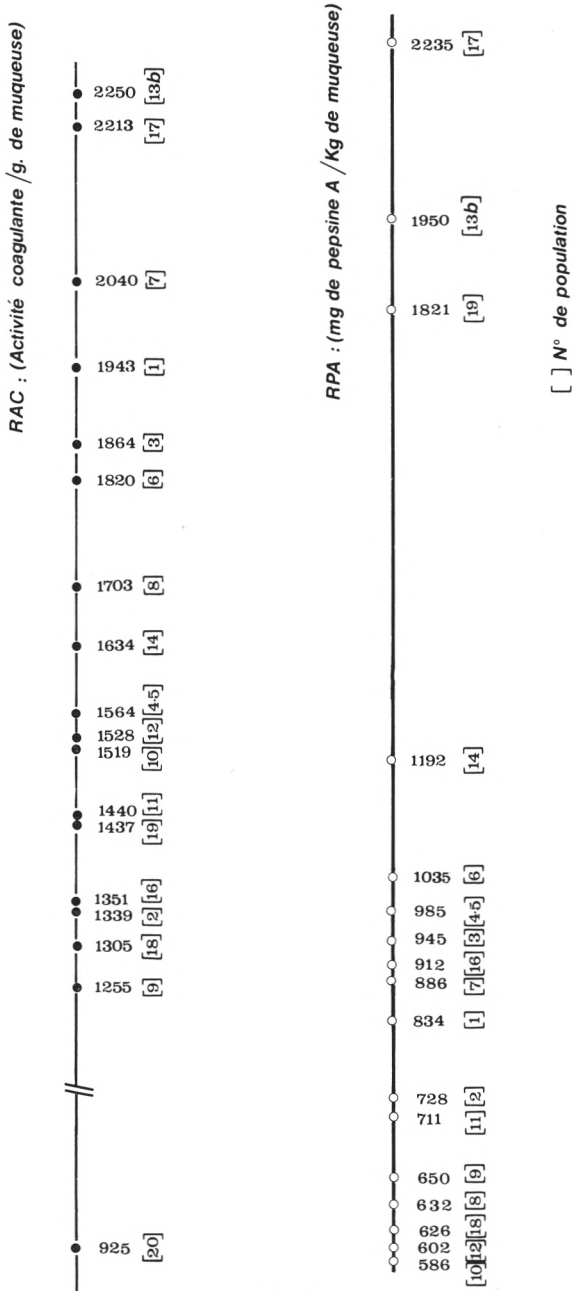


fig. 1

Classement des caillettes en fonction du rendement en activité coagulante et en activité de pepsine A.

en fonction des rendements d'extraction RAC (activité coagulante) et RPA (pepsine A), par ordre décroissant.

Les résultats obtenus par ces classements sont montrés dans le tableau 13 et dans la figure 1.

Enfin, le rendement d'extraction peut être utilisé pour calculer le nombre de caillettes nécessaires pour l'obtention d'une quantité donnée d'extrait contenant un taux d'enzyme défini. A titre d'exemple, et à partir des valeurs moyennes de différents paramètres obtenus sur les caillettes utilisées dans ce travail, nous avons calculé le nombre nécessaire de caillettes pour obtenir 1 l d'extrait de pepsine bovine commerciale contenant 1 300 mg de pepsine A.

|  |   |   |       |
|--|---|---|-------|
| Poids moyen de la muqueuse d'une caillette     | = | 548                                     | g     |
| Quantité de pepsine A par kg de muqueuse (RPA) | = | 870                                     | mg    |
| Quantité de pepsine A dans 1 l d'extrait       | = | 1 300                                   | mg    |
| Nombre de caillettes                           | = | $1\ 300 \times 1\ 000 / 548 \times 870$ | = 2,7 |

### 3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans notre travail, nous avons disposé de caillettes d'origine parfaitement précise, sans pour autant avoir eu la possibilité de nous procurer les effectifs nécessaires dont nous avons besoin du point de vue statistique. Cette contrainte importante nous empêche de répondre à certaines questions, d'autant plus que la très grande dispersion de toutes les populations de caillettes utilisées [11] limite considérablement la portée des résultats ici présentés.

Toutefois, il est possible de tirer de ce *travail exploratoire* un certain nombre de tendances intéressantes que nous exposons ci-dessous.

#### 3.1. Effet de la race, du sexe et de l'âge sur le contenu en protéases gastriques de la caillette de bovins à l'état ruminant

On peut signaler certaines tendances concernant l'effet de la race, du sexe et de l'âge sur le contenu enzymatique des caillettes.

- *L'effet de la race* est tiré de la comparaison des caillettes obtenues d'animaux appartenant à cinq races différentes. Il s'est manifesté au niveau de l'activité coagulante, de la teneur en pepsine A et en pepsine B. Seule, la chymosine ne semble pas être affectée par ce facteur de variation parmi les populations comparées. Par ailleurs, une interaction race/sexe concernant les pepsines A et B a été montrée pour trois races. Ceci signifie que l'influence de la race sur ces protéases est différente selon le sexe des animaux étudiés. Le contenu enzymatique des caillettes semble varier consi-

dérablement en fonction de la race, comme le montrent les résultats présentés dans les tableaux 4 et 6.

On peut conclure que *la race semble être un facteur de variation très important susceptible d'influencer le contenu enzymatique en protéases gastriques de la caillette.*

• *L'effet du sexe* a été mis en évidence à l'intérieur de trois races seulement. Il affecte l'activité coagulante et la pepsine B, mais ces résultats sont trop restreints pour que l'on puisse tirer une conclusion générale.

• *L'effet de l'âge* chez les animaux âgés de 15 à 24 mois n'a pas pu être étudié complètement au cours de cette période. Nous avons constaté seulement, entre les âges 24, 22 et 20 mois, des différences significatives concernant l'activité coagulante et la pepsine B. Il nous est impossible de conclure sur l'évolution du contenu enzymatique de la caillette entre les âges de 15 à 24 mois.

L'effet de l'âge entre jeunes animaux (16-18 mois) et vaches de réforme (69 mois, âge moyen) semble être plus évident. En effet, les résultats ont montré des différences significatives importantes pour l'activité coagulante, la teneur en chymosine, et pour le rendement d'extraction calculé en fonction de l'activité coagulante. Les jeunes animaux révèlent des moyennes plus élevées pour ces variables et, en même temps, des valeurs plus faibles pour les poids de muqueuse et d'extrait (tab. 12). Or, nous avons comparé les activités coagulantes totales (correspondant à la totalité de la muqueuse de la caillette) et nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les deux groupes d'animaux. Ce résultat, s'il était confirmé lors d'un grand nombre de comparaisons analogues et pour des races différentes, permettrait de penser qu'un affaiblissement de la capacité sécrétrice de la muqueuse serait compensé par l'augmentation de sa taille. La quantité totale d'enzymes sécrétée serait alors du même ordre tout au long de la vie.

En ce qui concerne le poids de la caillette, de la muqueuse et de l'extrait, on constate une influence de la race et du sexe. L'effet de l'âge sur ces trois variables n'a été observé qu'entre les jeunes animaux et les vaches de réforme. Comme il fallait s'y attendre, le poids vif est influencé par la race, le sexe et l'âge.

L'éventuelle influence du régime alimentaire sur le contenu enzymatique des caillettes n'a pas pu être étudié au cours de ce travail, faute d'effectifs adéquats. Toutes les comparaisons réalisées relatives à l'influence de la race, du sexe et de l'âge ont été faites à partir de caillettes d'animaux nourris avec le même régime. Dans les plans 5 et 9 de l'analyse de variance, nous avons admis a priori que le régime alimentaire n'avait pas d'influence, chez les bovins à l'état ruminant, sur la sécrétion des protéases gastriques.

Une telle influence semble, au premier abord, difficile à mettre en évidence. En effet, nous savons que chez le veau pré-ruminant, la nature des protéines du régime alimentaire influe la sécrétion de chymosine ; la sécrétion de pepsine n'est pas affectée. Par ailleurs, on sait que, chez le ruminant, les protéines de la ration arrivent à la caillette plus ou moins remaniées par suite de l'action des microorganismes du rumen. Dans ces conditions, une étude tendant à montrer l'influence des protéines du régime alimentaire sur la sécrétion des protéases gastriques chez le ruminant devrait partir notamment d'un régime dans lequel les protéines seraient protégées (action du formol, du tanin, etc.) pour les préserver de l'action de la flore du rumen, ou bien de l'infusion directe dans la caillette des protéines à l'essai.

### 3.2. Caractéristiques des caillettes à utiliser pour la préparation d'extraits coagulants

Comme il a été indiqué, la préparation d'un extrait coagulant comporte essentiellement la récupération dans l'extrait des protéases contenues dans la muqueuse de la caillette. Sur ce point, deux aspects méritent d'être soulignés :

1. Comme nous l'avons mentionné, à partir d'un poids (PM) de muqueuse, on obtient un poids (PE) d'extrait clarifié. Les équations de régression entre ces deux variables, établies à partir de poids de muqueuse provenant d'animaux de races différentes (par. 2.2.1.2.) peuvent être significativement différentes. Cela signifie qu'en partant d'un même poids de muqueuse prélevé de caillettes de races différentes, on obtiendrait, en moyenne, des poids d'extraits différents. L'origine de la muqueuse jouerait un rôle dans le rendement d'extraction, indépendamment de son contenu enzymatique. En effet, il affecterait la variable PE dans la formule de calcul du rendement d'extraction :

$$\text{RAC} = \text{AC} \times \text{PE/PM.}$$

2. Le deuxième aspect concerne le contenu enzymatique de la muqueuse en relation avec l'activité coagulante.

Nous avons montré (par. 2.1.2.3.) l'équation de régression entre l'activité coagulante et le contenu des trois protéases gastriques. Dans le cas des caillettes d'animaux de race Limousine, il a été montré que la variable explicative principale de l'activité coagulante était la teneur en pepsine A. Ce résultat s'explique par le fait que cette enzyme est plus active que la pepsine B et la chymosine autour du pH 5,0 auquel était ajusté le substrat employé pour la détermination de l'activité coagulante. Il est fort possible que cette observation puisse être étendue à d'autres races.

En partant de l'équation de régression entre l'activité coagulante et le contenu en pepsine A,  $\text{AC} = 1,47 \text{ PA} + 273$ , déjà citée, on

peut prédire la valeur de AC en fonction de PA. Mais cette équation ne peut pas être généralisée. En effet, elle prédit des valeurs de AC ne s'écartant pas trop des valeurs observées dans le cas des extraits obtenus à partir de caillettes d'animaux de race Limousine, mais elle fournit des écarts considérables dans le cas d'autres races.

Ceci peut être attribué à la méthode de dosage de la pepsine A d'une part, et d'autre part à la dénaturation de la pepsine A au cours de la préparation des extraits ou de leur conservation.

En effet, le dosage effectué par immuno-électrophorèse détermine un taux d'enzyme dont une partie peut être dénaturée.

On pourrait penser par ailleurs que l'activité coagulante spécifique des protéases gastriques est susceptible d'être influencée par la race (par suite d'un éventuel polymorphisme génétique).

Ces considérations permettraient d'expliquer certaines différences observées lors du classement de 18 populations de caillettes, effectué selon leur activité coagulante (RAC) et selon leur contenu en pepsine A (RPA). La différence entre les rangs occupés par les populations 19 et 14 (tab. 13 et fig. 1) porte à penser à une dénaturation de la pepsine A. En ce qui concerne les résultats de ces deux classements, nous tiendrons compte uniquement de celui obtenu en fonction de l'activité coagulante. Ce paramètre est un critère de choix pour estimer l'aptitude des caillettes dans l'optique de leur utilisation pour l'obtention d'extraits coagulants. L'examen des résultats obtenus (tab. 13 et fig. 1) affirme les tendances déjà signalées par les résultats de l'analyse de variance. Une influence très importante de la race est observée à l'intérieur des populations appartenant à une même tranche d'âge, par exemple des différences de l'ordre de 42 p. 100 entre les rangs 1 et 16. Une influence importante de l'âge s'observe également à l'intérieur d'une même race (par exemple différence entre les rangs 4 et 15), ainsi qu'une influence du sexe (rangs 9 et 15).

Ces résultats montrent également que les caillettes les plus intéressantes pour l'obtention d'extraits coagulants dans les trois tranches d'âges étudiées sont les suivantes :

15-18 mois : taurillons des races *Frisonne* et *Montbéliarde*.

19-22 mois : taurillons de race *Charolaise*.

24 mois : taurillons et bouvillons de races *Normande* et *Charolaise*.

Par ailleurs, on observe :

— que les races *Salers*, *Limousine* et *Hereford* occupent des rangs assez bas ainsi que les vaches de réforme ;

— que les variations importantes se manifestent parmi les races *Normande* et *Charolaise* en fonction du sexe et de l'âge.

Compte tenu de la grande dispersion à l'intérieur des populations et de la faiblesse des effectifs, la portée de ces premières observations est obligatoirement très restreinte.

## Remerciements

*Nous remercions très vivement Mme L. Tassencourt pour la précieuse collaboration qu'elle nous a prodiguée dans l'étude statistique de ce travail. Nous remercions également MM. G. Cuyllé et Y. Geay de nous avoir fourni l'échantillonnage de caillettes. Enfin, nous remercions M. B. Ribadeau-Dumas pour les conseils et les suggestions qu'il nous a apportés dans la réalisation de ce travail ainsi que dans la rédaction du manuscrit.*

## Résumé

Des caillettes de taurillons, de bouvillons, de génisses et de vaches de réforme, dont la race, l'âge et le régime alimentaire étaient connus, ont servi à la préparation d'extraits coagulants sur lesquels l'activité coagulante et le contenu en pepsine A et B et en chymosine furent déterminés. Par ailleurs, d'autres variables relatives à l'extrait coagulant ont été relevées : poids de la caillette, poids de la muqueuse et poids de l'extrait. Malgré une très grande dispersion observée entre les différentes populations de caillettes examinées, les principales tendances suivantes ont été mises en évidence :

- La race a une influence significative sur la sécrétion des protéases gastriques des bovins à l'état ruminant. Elle affecte l'activité coagulante : Normande > Limousine ; Charolaise > Limousine ; Normande > Charolaise > Limousine ; Frisonne > Salers. Elle influe également sur le contenu en pepsine A (Normande > Limousine ; Frisonne > Salers) et sur le contenu en pepsine B (Normande > Limousine ; Charolaise > Limousine).

L'influence du sexe s'est révélée significative pour la race Limousine au niveau de l'activité coagulante et du contenu en pepsine B : génisses > bouvillons > taurillons. Pour les races Normande et Limousine au niveau de la pepsine B : bouvillons > taurillons.

Une interaction race/sexe a été observée pour la pepsine A (taurillons/génisses et races Limousine/Charolaise) et pour la pepsine B (taurillons/bouvillons et races Normande/Limousine).

- L'influence de l'âge a été notamment mise en évidence entre les jeunes animaux (15-18 mois) et vaches de réforme (âge moyen 69 mois) de race Frisonne : les jeunes animaux avaient dans leurs caillettes une activité coagulante et un contenu en chymosine plus élevés que les vaches de réforme.

- La pepsine A est l'enzyme prépondérante dans la caillette des bovins à l'état ruminant (environ 90 p.100 des trois enzymes présentes). Les proportions de pepsine B et de chymosine sont à peu près du même ordre.

• Un classement a été établi pour juger l'aptitude à la préparation d'extraits coagulants à partir de caillettes de jeunes animaux et de vaches de réforme de races Charolaise, Frisonne, Hereford, Limousine, Montbéliarde, Normande et Salers : les caillettes les plus intéressantes semblent être celles des jeunes animaux des races Frisonne, Montbéliarde, Charolaise et Normande.

Les relations entre l'activité coagulante et le contenu en pepsine A des extraits préparés à partir de caillettes d'animaux de différentes races, et celles entre le poids de la muqueuse et le poids de l'extrait ont été étudiées.

### Summary

#### A STUDY OF BOVINE RUMINANT VELS FOR THE PREPARATION OF BOVINE PEPSIN EXTRACTS.

#### II. Influence of breed, age and sex on the enzyme content

Extracts of vells from bull-calves, young bullocks, heifers and culled cows of know breeds, age and diet were prepared. The weights of vells, mucosa, and extracts, and pepsins A and B and chymosin contents and the clotting activity of extracts were measured.

Despite the large individual variations encountreed, the following main trends were observed :

1. The breed had a significant influence on the enzyme content of the vells. It affected the clotting activity : Normande > Limousine; Charolaise > Limousine; Normande > Charolaise > Limousine; Frisonne > Salers.

It also affected the pepsin A content (Normande > Limousine; Frisonne > salers ; and the pepsin B content (Normande > Limousine ; Charolaise > Limousine).

2. The influence of sex was significant for Normande and Limousine breeds with regard to the pepsin B content (young bullocks > bull-calves). Within the Limousine breed, significant differences were observed for clotting activity and pepsin B content: heifers > young bullocks > bull-calves.

A breed/sex interaction was observed for pepsin A (bull-calves/ young bullocks and Normande/Limousine breeds).

3. The influence of age was detected between young animals (15-18 months) and culled cows (average age 69 months) of Frisonne breed: the clotting activity and chymosin contents of the vells were higher in young animals.

4. Pepsin A was the predominant enzyme in the vells of ruminant adult animals (ca. 90 p. 100 of the 3 enzymes). Pepsin B and chymosin were approximately at the same level.

5. The vells of young animals and culled cows were classified according to clotting activity of the extracts from Charolaise, Fri-

sonne, Hereford, Limousine, Montbéliarde, Normande and Salers breeds.

The most convenient vells for the preparation of coagulating extracts were from young animals of Frisonne, Montbéliarde, Charolaise and Normande breeds.

6. The relationships were studied between the clotting activity and pepsin A content of the extracts and the mucosa and extract weights, from vells of animals of various breeds.

*Reçu pour publication en juin 1981.*

### Bibliographie

- [1] DOUILLARD (E.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1970). — Détermination avec la caséine  $\chi$  de l'activité protéolytique de la présure, de la pepsine de porc et des pepsines bovines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52, 1429.
- [2] GARNOT (P.), THAPON (J. L.), MATHIEU (C. M.), MAUBOIS (J. L.) and RIBADEAU-DUMAS (B.) (1972). — Determination of rennin and pepsin in commercial rennets and abomasal juices. *J. Dairy Sci.*, 55, 1641.
- [3] GEAY (Y.), ROBELAIN (J.) et BOCCARD (R.) (1975). — Caractéristiques d'engraissement des bovins limousins : cas de jeunes bovins. *Bull. Tech. C.R.Z.V. de Theix*, 22, 29.
- [4] GORINI (L.) et LANZAVECCHIA (G.) (1954). — Recherches sur le mécanisme de production d'une protéinase bactérienne. I. Nouvelle technique de détermination d'une protéinase par coagulation du lait. *Biochem. Biophys. Acta*, 14, 407.
- [5] MULLER (A.) et BÉRANGER (C.) (1978). — Production de jeunes bœufs à partir d'herbe verte ou ensilée, complétementée avec des pulpes sèches. *Bull. Tech. C.R.Z.V. de Theix*, 31, 5.
- [6] PORCHER (C.) (1930). — La méthode synthétique dans l'étude du lait. Le lait au point de vue colloïdal. Recherches sur le mécanisme de l'action de la présure. *Le Lait*, 10, 291-323.
- [7] ROTHE (G. A. L.), AXELSEN (P.), JOHNS (P.) and FOLTMANN (B.) (1976). — Immunochemical chromatographic and milk-clotting measurements for quantification of milk-clotting enzymes in bovine rennets. *J. Dairy Res.*, 43, 85.
- [8] SNEDECOR (G. W.) & COCHRAN (W. G.) (1971). — Métodos estadísticos. Cia Editorial Continental S.A. México.
- [9] VALLES (E.), VASSAL (L.) et RIBADEAU-DUMAS (B.) (1977). — Utilisation d'une préparation de pepsine bovine dans la fabrication de fromages à pâte molle, à pâte pressée et à pâte cuite. *Rev. Lait*, 350, 87.
- [10] VALLES (E.) et FURET (J. P.) (1977). — Etudes des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine. I. Méthodes d'extraction. *Le Lait*, 57, 601.
- [11] VALLES (E.) (1980). — Les protéases gastriques bovines utilisées en fromagerie. Thèse Docteur-Ingénieur, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay.