

## Liste des abréviations

<b>C</b>	:	Concentration
<b>DO</b>	:	Densité optique
<b>E</b>	:	Enzyme
<b>K<sub>m</sub></b>	:	Constante de Michaelis
<b>L</b>	:	Langueur de la cuve
<b>MF</b>	:	Matière fraîche
<b>PA</b>	:	Phosphatase acide
<b>pH</b>	:	Potentiel d'hydrogène
<b>pNP</b>	:	Para-nitrophénol
<b>pNPP</b>	:	Para-nitrophénylphosphate
<b>q.s.p</b>	:	Quantité suffisante pour
<b>R</b>	:	Radical
<b>S</b>	:	Substrat
<b>t</b>	:	Temps d'incubation
<b>T°</b>	:	Température
<b>V<sub>f</sub></b>	:	Volume final
<b>V<sub>i</sub></b>	:	Vitesse initiale
<b>V<sub>int</sub></b>	:	Volume initiale
<b>V<sub>m</sub></b>	:	Vitesse maximal
<b>V<sub>s</sub></b>	:	Activité spécifique
<b>V<sub>t</sub></b>	:	Activité totale
<b>V/V</b>	:	Volume sur volume
<b>ε</b>	:	Coefficient de d'extinction molaire

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Systématique de l' <i>Aloe vera</i> selon deux classifications botaniques; Conquist et APG III.....	10
<b>Tableau 2 :</b> Spécificité de la phosphatase acide.....	16
<b>Tableau 3:</b> Activité phosphatase acide <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans le milieu réactionnel contenant le phényl- phosphate disodique.....	16
<b>Tableau 4:</b> Activité phosphatase acide dans le milieu réactionnel <i>in vivo</i> dans différentes parties d'une feuille d' <i>Aloe vera</i> .....	17
<b>Tableau 5 :</b> Activité PA en $\mu\text{M}/\text{min}$ de 5 feuilles d' <i>Aloe vera</i> de différents âges.....	18
<b>Tableau 6 :</b> Activité phosphatase acide en $\mu\text{M}/\text{min}$ de différente concentration d'enzyme...21	
<b>Tableau 7:</b> Activité PA à deux valeurs de pH différentes 5 et 11.....	22

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Plante d' <i>Aloe vera</i> .....	2
<b>Figure 2 :</b> Coupe transversale d'une feuille d' <i>Aloe vera</i> .....	3
<b>Figure 3 :</b> <i>Aloe vera</i> .....	10
<b>Figure 4 :</b> Courbe d'étalonnage du phénol.....	12
<b>Figure 5 :</b> Courbe d'étalonnage du pNP.....	13
<b>Figure 6 :</b> Différentes parties d'une feuille d' <i>Aloe vera</i> ; partie basale (5, 6), médiane (1, 2, 3, 4) et apicale (0) .....	14
<b>Figure 7 :</b> Cinq feuilles d' <i>Aloe vera</i> d'âges différents numérotées de 1 à 5 de haut vers le bas.....	15
<b>Figure 8 :</b> Illustration des résultats obtenus pour la cinétique enzymatique en fonction du temps d'incubation.....	18
<b>Figure 9 :</b> Cinétique enzymatique en fonction du temps.....	18
<b>Figure 10 :</b> Illustration des résultats obtenus pour la cinétique enzymatique en fonction de la concentration du substrat.....	19
<b>Figure 11:</b> Courbe de Michaelis représentant $V_i = f([S])$ .....	19
<b>Figure 12:</b> Courbe de Lineweaver-Burk représentant $1/V_i = f(1/[S])$ .....	20
<b>Figure 13 :</b> Illustration des résultats obtenus pour la cinétique enzymatique en fonction de la [E].....	20
<b>Figure 14:</b> Cinétique enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme.....	21
<b>Figure 15:</b> Effet de la température sur l'activité de la phosphatase acide.....	22

# Résumé

La présente étude réalisée au laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement (FST FES) est consacrée à la mise en évidence de la phosphatase acide dans les feuilles d'*Aloe vera* et de déterminer les paramètres cinétiques et physico-chimiques de cette enzyme.

Les résultats obtenus ont révélé que le gel des feuilles d'*Aloe vera* contient la phosphatase acide, ses paramètres cinétiques et physico-chimiques selon cette étude sont :

- $K_m = 5 \text{ mM}$
- $V_m = 20 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$
- Une température optimale de  $60^\circ\text{C}$ .
- pH optimal de 5

La phosphatase acide hydrolyse deux substrats (le pNPP et le Phényl-phosphate disodique). Son activité sur le pNPP est la plus élevée.

L'activité de cette enzyme est plus importante dans la partie apicale de la feuille quel que soit son âge. En plus cette activité est plus importante dans les feuilles jeunes. La partie apicale d'une part et les feuilles jeunes d'autre part contiennent des cellules méristématiques où le métabolisme est très actif ce qui explique l'activité phosphatase acide plus élevée.

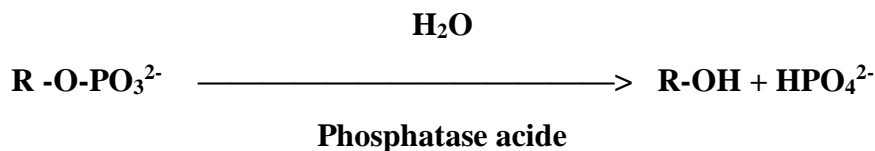
**Mots clés :** Phosphatase acide, *Aloe vera*

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Partie I : Revue bibliographique</b>	
I.    Généralité sur l' <i>Aloe vera</i> .....	2
1. Définition.....	2
1.1. Description botanique.....	2
1.1.1. Aspect général.....	2
1.1.2. Feuille.....	2
2. Composition chimique.....	3
3. Propriétés médicinales.....	7
II.   Généralité sur la phosphatase acide.....	8
<b>Partie II. Matériel et méthodes</b>	
I.    Matériels.....	9
1. Matériel biologique.....	9
2. Réactifs.....	10
II.   Méthode.....	11
1. Prélèvement du gel.....	11
a. Méthode <i>in vitro</i> .....	12
b. Méthode <i>in vivo</i> .....	12
2. Technique de mesure de l'activité phosphatase acide.....	12
3. Variation de l'activité phosphatase acide <i>in vivo</i> dans différentes parties d'une feuille d' <i>Aloe vera</i> .....	14
4. Cinétique enzymatique en fonction du temps d'incubation.....	14
5. Détermination des paramètres cinétique de la phosphatase acide.....	14
6. Effet de la concentration d'enzyme.....	15
7. Variation de l'activité phosphatase acide en fonction de l'âge des feuil.....	15
8. Caractéristiques physico-chimiques de la phosphatase acide.....	15
a. Effet de pH.....	15
b. Effet de température.....	15
<b>Partie III. Résultats et discussion</b>	
1. Test enzymatique et spécificité du substrat.....	16
2. Comparaison de la méthode <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	16
3. Variation de l'activité phosphatase acide <i>in vivo</i> dans différentes parties d'une feuille d' <i>Aloe vera</i> .....	17
4. Variation de l'activité phosphatase acide en fonction de l'âge des feuilles.....	17
5. Cinétique enzymatique en fonction du temps d'incubation.....	18
6. Détermination des paramètres cinétiques de la phosphatase acide.....	19
7. Effet de la concentration d'enzyme.....	20
8. Caractéristiques physico-chimiques de la phosphatase acide.....	21
a. Effet de pH.....	21
b. Effet de température.....	22
<b>Conclusion</b> .....	24
<b>Références bibliographiques</b> .....	

## Introduction général

Les phosphatases acides regroupées sous le code (EC. 3.1.3.2, orthophosphoric-monoesterphosphohydrolase) forment un groupe des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons esters phosphoriques avec libération de phosphates inorganiques (Pi) dans un environnement acide (pH de 5,0 à 6,0) (**Kouadio EJP et al., 2006**)<sup>[1]</sup>. Selon la réaction :



Avec : - R : radical

Les phosphatases acides ont été étudiées aussi bien chez les végétaux que les animaux et les microorganismes (**Kouadio EJP et al., 2006**)<sup>[1]</sup>.

Elles sont impliquées dans l'assimilation de phosphate inorganique ou dans des fonctions métaboliques, telles que des mécanismes de régulation, de production d'énergie ou de transduction des signaux intracellulaires (**Kouadio EJP et al., 2009**)<sup>[2]</sup>.

Par ailleurs, des études récentes indiquent l'utilisation des phosphatases acides dans l'hydrolyse des diverses formes de phosphates organiques des sols d'une part et dans l'hydrolyse des pesticides phosphorés d'autre part, montrant ainsi l'intérêt actuel de ces enzymes (**Kouadio EJP et al., 2009**)<sup>[2]</sup>.

L'*Aloe vera* fait partie des aloès (près de 420 espèces tout de même) appartenant selon les classifications, soit à la famille des Aloécées, soit à la famille des Xantorhécées et celui qu'on utilise en thérapeutique porte le nom officiel d'*Aloe barbadensis miller*. On le trouve notamment dans les régions tropicales ou subtropicales où il pousse à l'état sauvage. Il présente des feuilles épaisses, de forme triangulaire, dont la pulpe n'est autre que le gel d'*Aloe vera* qui est très riche en vitamines, minéraux, enzymes et acides aminés ressemble à un dictionnaire de la nutrition (**Natacha MICHAYEWICZ, 2013**)<sup>[3]</sup>.

Le but de notre présent travail consiste à chercher l'activité de la phosphatase acide dans le gel des feuilles d'*Aloevera*, et étudié les paramètres cinétiques et physico-chimiques.

**Partie I :**

# **Revue bibliographique**

---

Rapport-Gratuit.com

# I. Généralité sur l'*Aloe vera*

## 1. Définition

L'*Aloe vera* ou *Aloe barbadensis miller* est une plante succulente vivace sans tige fait partie des aloès dont il existe près de 420 espèces mais seule quelques-unes sont reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques. Elle appartient, selon les classifications, soit à la famille des Aloécacées, soit à la famille des Xantorhécacées. Elle est originaire de l'Afrique du Sud et de l'Est, et a été introduite par la suite au nord de l'Afrique, dans la péninsule arabe, la Chine, les pays méditerranéens et les Antilles (Natacha MICHAYEWICZ, 2013) [3]. Prénommée également «Le Lys du désert», cette plante est facile à cultiver car malgré le fait qu'elle pousse à l'extérieur dans les pays chauds, elle peut également pousser à l'intérieur, dans des pots, dans le monde entier [5].

### 1.1. Description botanique

#### 1.1.1. Aspect général



*Figure 1:Plantes d'Aloe vera*

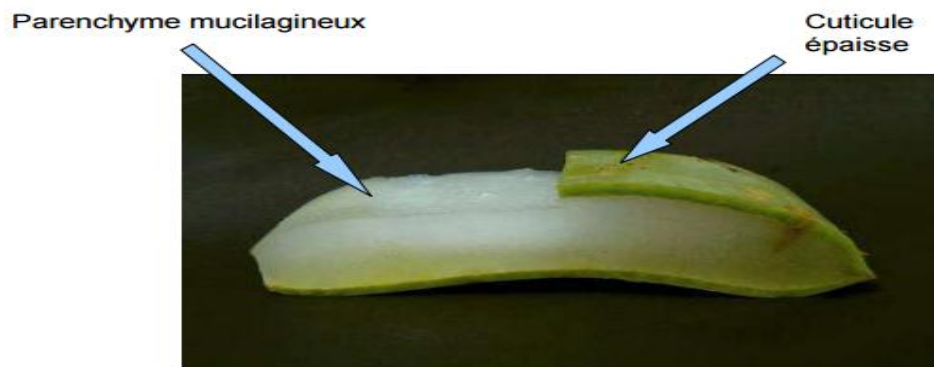
En raison des crêtes épineuses qui protègent la feuille souple, l'*Aloe vera* est souvent prise pour un cactus. C'est en fait une plante vivace succulente, arborescente, d'environ 1m de hauteur, aux racines courtes et peu profondes (Natacha MICHAYEWICZ, 2013) [3].

#### 1.1.2. Feuille

Ces feuilles charnues lisses de couleur verte, à section triangulaire, aux extrémités pointues, dont les plus grandes peuvent atteindre 80 cm de hauteur et 10 cm dans leur plus grande largeur avec des bords munis d'épines jaune clair [5].

Ces feuilles épaisses et elliptiques présentent en coupe transversale une structure particulière. Voici ci-dessous l'aspect de la feuille fraîche coupée.





**Figure2:** Coupe transversale d'une feuille de l'*Aloe vera*

Une coupe transversale de l'une de ces feuilles permet de distinguer de l'extérieure vers l'intérieure

- la cuticule.
- une couche épidermique chlorophyllienne.
- une zone sous épidermique dans laquelle circule une sève ou suc rouge brunâtre tirant sur le jaune et appelé le sang de l'aloès : substance très amère à partir de laquelle sont préparées les formes traditionnelles d'utilisation pharmaceutique à visée digestive et notamment laxative.
- au centre le parenchyme mucilagineux incolore très épais qui est le gel d'aloès

(MORIN. E, 2008) <sup>[4]</sup>.

Les Caractéristiques principales du gel :

- son aspect est visqueux.
- l'absence de couleur, transparent.
- l'absence d'odeur.
- son gout légèrement amer (MORIN. E, 2008) <sup>[4]</sup>.

## 2. La composition de l'*Aloe vera*

La pulpe d'*Aloe vera* est composée d'environ 98,5 % d'eau alors que le gel seul comporte 99,5 % d'eau. La différence, soit 0,5-1%, représente la matière solide. Il s'agit d'un ensemble de composés qui sont des vitamines, minéraux, enzymes, polysaccharides, composés phénoliques et acides organiques, dans plusieurs proportions variables (Natacha MICHAYEWICZ, 2013) <sup>[3]</sup>.

### ➤ Les vitamines

Les aloès contiennent de très nombreuses vitamines dont :

- Des vitamines liposolubles

- **Vitamine A (carotène) :** Améliore la vision, favorise la santé de la peau et des os, protège les cellules des radicaux libres.
- **Vitamine C (acide ascorbique) :** En association avec la vitamine E, combat l'infection par stimulation du système immunitaire, favorise la cicatrisation et maintient la santé de la peau.
- **Vitamine E (tocophérol) :** Avec la vitamine C, protège la membrane des cellules et aide à combattre les infections et à les guérir.
  - **Des vitamines hydrosolubles**
- **Vitamine B1 (thiamine) :** intervient dans la dégradation des sucres.
- **Vitamine B2 (riboflavine) :** intervient de nombreuses réactions d'oxydoréductions.
- **Vitamine B3 (niacine) :** Aide à régulariser le métabolisme.
- **Vitamine B6 (pyridoxine) :** coenzyme dans le métabolisme des acides aminés.
- **Vitamine B9 (acide folique) :** participe au métabolisme des protéines et du matériel génétique.
- **Vitamine B12 (cyanocobalamine) :** Indispensable au métabolisme, facteur énergétique pour les fonctions nutritives du corps et favorise la formation des globules rouges.
- **L'inositol :** facteur lipotrope appartenant au groupe des vitamines B, mobilise les graisses en évitant leur accumulation (MORIN. E, 2008) <sup>[4]</sup>.

### ➤ **Les minéraux**

L'*Aloe vera* contient plus de 20 sels minéraux, tous essentiels à l'organisme humain.

- **Calcium :** Croissance des os et des dents, en association avec le phosphore.
- **Chlore :** Antiseptique et désinfectant.
- **Chrome :** Facilite la régulation du taux de sucre dans le sang et le système circulatoire.
- **Cuivre :** Oligo-élément indispensable à l'équilibre de l'organisme, et la formation du sang.
- **Fer :** Apporte l'oxygène aux globules rouges et favorise la résistance à l'infection.
- **Magnésium :** En association avec le manganèse, maintient le bon fonctionnement du système nerveux et des muscles.
- **Manganèse :** En association avec le magnésium, maintient le bon fonctionnement du système nerveux et des muscles.
- **Phosphore :** Croissance osseuse, en association avec le calcium.
- **Potassium (sorbate de potassium) :** Régulation des composants fluides du sang et des muscles.

- **Sodium** : Avec le potassium, maintient les niveaux d'équilibre de l'eau dans le corps, transporte les acides aminés et le glucose vers les cellules.
- **Zinc** : Stimule le système immunitaire et l'activité des protéines dans la cicatrisation <sup>[4] [5]</sup> [6].

➤ **Les acides aminés essentiels**

Les acides aminés jouent un rôle dans toutes les fonctions de l'organisme : fournir de l'énergie, participer aux fonctions cérébrales (y compris celles d'ordre émotionnel) intervenir dans la régénération des tissus, etc. « Essentiels » signifie que l'organisme n'est pas en mesure de les fabriquer lui-même..., 7 des 8 acides aminés classés « essentiels » sont présents dans l'*Aloe vera*, de même que 12 des 14 acides aminés dits « secondaires », que notre organisme synthétise à partir des 8 acides aminés essentiels.

- **Acides aminés essentiels:** Isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, valine.
- **Acides aminés secondaires** : Acide aspartique, acide glutamique, alanine, arginine, cystine, glycine, histidine, glutamine, asparagine, proline, sérine, tyrosine (**MORIN. E, 2008**) <sup>[4]</sup>.

➤ **Lignine, saponines, anthraquinones**

La **lignine** pénètre facilement dans la peau. Les **saponines** sont à la fois dépuratives et antiseptiques. Les **anthraquinones** ont des propriétés analgésiques et laxatives :

- **Barbaloïne** : Antibiotique et cathartique.
- **Isobarbaloïne** : Analgésique et antibiotique.
- **Anthranol** : Fixe le dioxygène.
- **Anthracène** : Fixe le dioxygène.
- **Acide aloétique** : Antibiotique.
- **Emodine d'Aloès** : Bactéricide et laxative.
- **Acide cinnamique** : Détergent, germicide et fongicide.
- **Ester d'acide cinnamique:** Calmant.
- **Huile étherée** : Analgésique et anesthésique.
- **Acide chrysophanique** : Fongicide (champignons cutanés).
- **Aloelcine** : Bloque les sécrétions gastriques par réaction avec l'histamine.
- **Resestanoïde** : Action anti-inflammatoire et bactéricide (agirait comme un corticoïde naturel) <sup>[4] [5] [6]</sup>.

➤ **Mono- et polysaccharides (glucides)**

Cellulose, glucose, galactose, mannose, xylose, aldéonose, acide uronique, L-rhamnose, acémannane, aloéride [4][5][6].

### ➤ **Les enzymes**

- **Amylase** : Catalyse hydrolyse de l'amidon en dextrine puis en maltose.
- **Bradykinase** : Stimule le système immunitaire, analgésique, anti-inflammatoire.
- **Catalase** : catalyse la décomposition de l'eau oxygénée en eau et oxygène empêchant l'accumulation de l'eau oxygénée dans le tissu.
- **Cellulase** : Aide à digérer la cellulose.
- **Créatine phosphorique** : Enzyme musculaire.
- **Lipase** : Facilite la digestion.
- **Nucléotidase** : Catalyse l'hydrolyse des nucléotides en nucléosides.
- **Phosphatase acide et alcaline** : enzymes déphosphorylantes.
- **Protéase**: Hydrolyse les protéines à l'intérieur de leurs constituants.
- **Carboxypeptidase** : catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique située à l'extrémité de la chaîne peptidique libérant ainsi l'acide aminé terminal.
- **Lactate déshydrogénase** : catalyse la conversion réciproque de pyruvate et de lactate en même temps que celle du couple  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ .
- **Cyclooxygénase** : régule la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines dans le processus inflammatoire.
- Oxydase, glutathion peroxydase (**MORIN. E, 2008**) [4].

### ➤ **Acides gras**

Tous insaturés et indispensables pour la santé, l'un d'entre eux, l'acide caprylique, est utilisé dans le traitement des mycoses. L'Aloès contient également de **l'acide salicylique**, de **l'acide chrysophanique**, des **huiles volatiles**, etc. [4][5][6].

### ➤ **L'acemannan**

Au cours des dernières décennies, des chercheurs isolèrent de nombreuses autres molécules actives dans l'*Aloe vera*, qui est spécialement riche en acemannan, qui opère en interaction avec le système immunitaire (il augmente la production de macrophages, facteurs de l'élimination des tumeurs) [4][5][6].

### ❖ **Autres constituants**

D'autres substances ont été découvertes dans le gel.

- **L'aloétine** est un germicide remarquable qui neutralise la toxicité de nombreux germes.
- **L'aloelucine** active la régénérescence cellulaire et accélère la guérison des ulcères.

- **L'aloésine** a une puissante action bactéricide.
- **L'aloémicine** semble posséder une action anti-tumorale efficace dans le traitement de certaines cellules cancéreuses <sup>[4] [5] [6]</sup>.

### 3. Les propriétés médicinales

De nombreuses études ont été réalisées sur les effets pharmacologiques de l'*Aloe vera* employé sous diverses formes et pour une utilisation externe ou interne. Un certain nombre de substances actives a été identifié dans le latex et le gel. Cependant, les mécanismes d'action de tous les composés n'ont pas encore été déterminés. Voilà ci-dessous certains effets médicinaux de l'*Aloe vera* :

- ✓ **Dermatologiques** : du fait de ses actions : hémostatique, anesthésique, bactéricide, cicatrisante et anti-inflammatoire (liées à nombre de ses composants, agissant vraisemblablement en parfaite synergie) qui sont toutes fondamentales pour obtenir rapidement la guérison d'une grande part de la pathologie cutanée traumatique (blessures, brûlures, irritations, etc.) ou non traumatique (les dermatoses en général) (**Osmoselr, 2012**) <sup>[7]</sup>.
- ✓ **Nutritionnelles**: dans le cadre de la complémentation alimentaire, la pulpe de l'*Aloe vera* apporte un appoint en éléments vitaux (acides aminés, minéraux et oligo-éléments, vitamines, etc.) quantitativement peu important mais qualitativement d'une très grande richesse. Cette richesse qualitative débouche sur une bonne rééquilibration organique et augmente la résistance du terrain biologique, lui permettant ainsi de mieux résister aux agressions de toutes sortes (microbiennes, stress, etc.) dont il est en permanence l'objet (**Osmoselr, 2012**) <sup>[7]</sup>.
- ✓ **Cosmétologiques**: du fait de ses extraordinaires actions cutanées : rééquilibration du pH cutané, desquamation des cellules mortes de l'épiderme, hydratation et nourrissage de la peau en profondeur, stimulation de la multiplication cellulaire des fibroblastes du derme, qui font de la pulpe de l'*Aloe vera* un véritable "régénérateur" cutané. Actions auxquelles s'ajoutent encore ses propriétés : astringentes, adoucissantes et protectrices, qui en font l'un des plus remarquables produits naturels de beauté que l'on puisse trouver (**Osmoselr, 2012**) <sup>[7]</sup>.
- ✓ **Digestives**: notamment une bien meilleure digestion des aliments (grâce aux nombreuses enzymes qu'elle contient) avec diminution des putréfactions intestinales ainsi qu'une légère action apéritive et une action tonifiante sur les intestins susceptible

de régulariser un transit intestinal ralenti, mais sans action laxative proprement dite. (Osmoselr, 2012) <sup>[7]</sup>.

- ✓ D'autres propriétés très importantes (anti-ulcéreuse gastrique, anti-diabétique, etc.) sont en cours d'études et en voie d'être reconnues (Osmoselr, 2012) <sup>[7]</sup>.

## II. Généralité sur les phosphatases acides :

Les phosphatases acides sont des enzymes qui catalysent à pH acide (pH 4 à 6) l'hydrolyse des phosphomonoesters avec formation de phosphate minéral et d'un alcool ou d'un phénol (Le Pihive, 2009) <sup>[8]</sup>.

Les phosphatases acides sont caractérisées chez des organismes eucaryotes et procaryotes (Le Pihive, 2009) <sup>[8]</sup>. Ils sont présents dans la plupart des cellules. Chez les végétaux, un certain nombre d'entre eux existent à la fois dans le cytoplasme, dans les membranes squelettiques des cellules, dans les chloroplastes et aussi localisées dans les peroxysomes (KAMENAN, 1984) <sup>[9]</sup>.

Les phosphatases acides ont été étudiées dans divers organes végétaux tels que ; tubercules, graines, feuilles, racines et bulbes (Kouadio EJP *et al.*, 2009) <sup>[2]</sup>.

Elles sont impliquées dans :

- ✓ L'assimilation de phosphate inorganique (Le Pihive, 2009) <sup>[8]</sup> ; dans l'hydrolyse et la solubilisation des macromolécules de phosphates organiques du sol en vue de leur utilisation par les plantes (Kouadio EJP *et al.*, 2009) <sup>[2]</sup>.
- ✓ Des mécanismes de régulation métaboliques, telles que, de production d'énergie ou de transduction de signaux intracellulaires (Le Pihive, 2009) <sup>[8]</sup>.
- ✓ Des applications dans l'industrie des engrais pour la biodisponibilité du phosphate inorganique (Pi) qui est généralement sous forme organique dans les sols et des additifs alimentaires pour les animaux monogastriques comme le porc (Kouadio EJP *et al.*, 2009) <sup>[2]</sup>.

La famille des phosphatases acides (EC 3.1.3.2) est constituée de nombreux sous-groupes classés selon leur spécificité de substrats, leur poids moléculaire et leur sensibilité à des inhibiteurs connus (Le Pihive, 2009) <sup>[8]</sup>.

Il catalyse la déphosphorylation de la plupart des phosphomonoesters: Tels que pNPP, le phénylphosphate, le phényl-phosphate disodique, l'inositol 1-phosphate, l'adénosine mono, di et triphosphate (AMP, ADP et ATP), le Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), Glucose-6-Phosphate, Fructose-1-Phosphate, Fructose-6-Phosphate, Pyrophosphate,

Uridine-5'-phosphate glucose, Uridine-5'-phosphate galactose. L'inositol 1, 4,5-triphosphate (IP3) et le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP2), etc... L'activité de la PA change selon différents substrats <sup>[1][2][8]</sup>.

**Partie II :**

**Matériel et méthodes**

---



L'activité de la PA est évaluée à pH acide, selon un principe simple : l'extrait enzymatique ou le morceau du gel est mis en présence d'un ester phosphorique dans des conditions précises du pH, temps, et température. On dose l'acide phosphorique libéré :

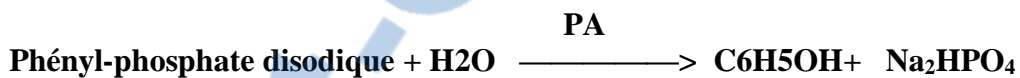


La difficulté essentielle consiste à trouver des substrats stables, qui ne s'hydrolysent pas spontanément. On s'est très vite orienté vers des substrats à noyau phénolique qui sont rapidement hydrolysés par des phosphatases.

- ✓ Certains d'entre eux facilitent le dosage en conduisant à la production d'un produit coloré par exemple le pNPP : le para-nitrophényl phosphate, composé incolore qui libère par hydrolyse du para-nitrophénol qui donne une coloration jaune en milieu alcalin et dosable directement par spectrophotométrie à 410nm.



- ✓ Et d'autre libère des composés incolores comme le phényl-phosphate disodique :




Le phénol libéré est ensuite dosé par colorimétrie. Le phénol mis en présence d'aminopyrine et du ferricyanure de potassium donne une quinone colorée en rouge et qui absorbe à 510 nm.

## I. Matériel

### 1. Matériel biologique

Les feuilles d'*Aloe vera* constituent notre matériel végétal ; c'est une espèce d'*Aloe* très connue pour ces vertus thérapeutiques. Elle est classée dans plusieurs familles on représente les deux classifications utilisées aujourd'hui <sup>[3]</sup>.

**Tableau 1:** Systématique de l’*Aloe vera* selon deux classifications botaniques; Conquist et APG III

Classification		
Conquist	APG III	
<b>Règne</b> : <i>Plantae</i>	<b>Clade</b> : Angiospermes	<i>Figure 3 : Aloe vera</i>
<b>Division</b> : Magnoliophyta	<b>Clade</b> : Monocotylédones	
<b>Classe</b> : Liliopsida	<b>Ordre</b> : Asparagales	
<b>Sous classe</b> : <i>Liliidae</i>	<b>Famille</b> : Xanthorrhoeaceae	
<b>Ordre</b> : Liliales	<b>Sous famille</b> : <i>Asphodeloideae</i>	
<b>Famille</b> : Aloeaceae		
<b>Genre</b> : <i>Aloe</i>		
<b>Espèce</b> : <i>Aloe vera</i>		

## 2. Réactifs

- Substrats : On utilise l’un des deux substrats différents :
  - Le pNPP (Para-Nitrophénylphosphate)
  - Le Phényl-phosphate disodique
- Mélange tampon : On utilise le tampon citrate de sodium de pH =5
  - Acide citrique..... 4,2 g
  - La soude 1 N.....40 ml
  - Eau distillée .....q.s.p. 100 ml
- Réactif 2 : Solution de bicarbonate de sodium :
  - Bicarbonate de sodium..... 4,2 g
  - Eau distillée.....q.s.p. 100 ml
- Réactif 3 : Solution d’aminoantipyrine :
  - Aminoantipyrine.....0,6 g
  - Eau distillée.....q.s.p. 100 ml
- Réactif 4 : Solution de Ferricyanure de potassium :

- Ferricyanure de potassium.....2, 4g
- Eau distillée.....q.s.p. 100 ml

- Solution de NaOH 0,5 N
- Solution mère étalon du phénol 10 mM (PM = 94)
- Solution mère étalon du pNP 10 mM (PM =140)
- Solution fille étalon du phénol 2 mM
- Solution fille étalon du pNP 1 Mm

## II. Méthodes

### 1. Prélèvement du gel

Un ou Plusieurs feuilles d'*Aloe vera* sont lavées, à l'aide d'un couteau on coupe la base blanchâtre ainsi que les bords épineux, puis on enlève la peau pour ne garder que le gel translucide se trouvant à l'intérieur.

#### a. Méthode *in vitro*

Dans un mortier préalablement refroidi, le gel récupéré est broyé, puis additionné de 2ml de l'acide acétique 20 % pour 50 ml de l'extrait. Le broyat obtenu est centrifugé à 2500 tours par min pendant 10 min. Le surnageant obtenu, constitue l'extrait enzymatique.

#### b. Méthode *in vivo*

On coupe des morceaux du gel d'une masse de 0.2 g qu'on incube dans un milieu réactionnel afin de mesurer l'activité phosphatase acide.

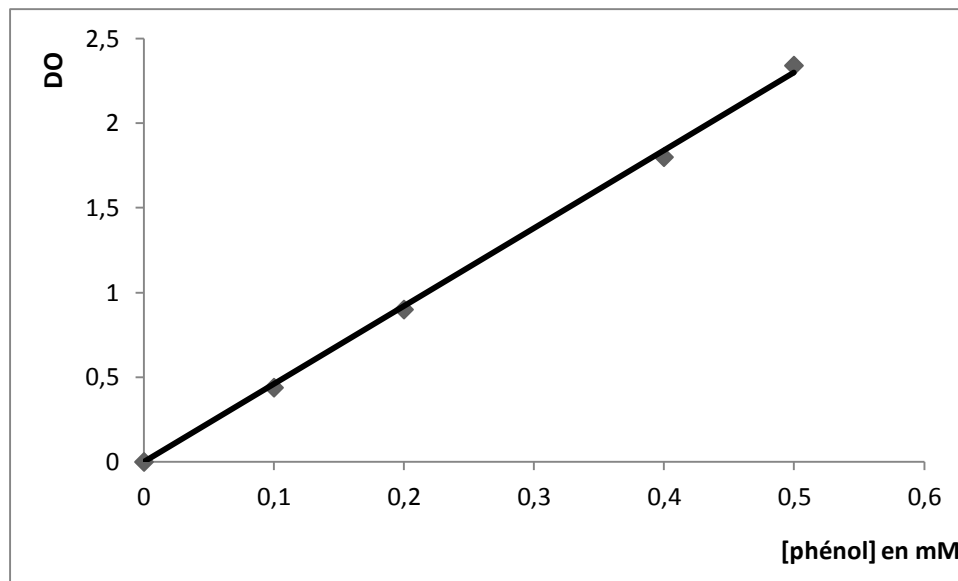
### 2. Technique de mesure de l'activité phosphatase acide

L'activité phosphatase acide est mesurée en incubant 200 µl de solution enzymatique (*in vitro*) ou bien 0.2g du gel (*in vivo*) dans un milieu réactionnel, composé de 500 µl de tampon citrate pH 5, 500 µl de substrat 20 mM, ce milieu est incubé au bain-marie à 37 °C. La réaction est arrêtée par l'addition de 500 µl de solution NaOH 0.5 N. Pour les tubes témoin l'addition de l'enzyme se fait après l'arrêt de la réaction. La quantité du produit libéré est dosée selon le type du substrat :

#### ➤ Pour le phényl-phosphate disodique

La quantité du phénol libérée est dosée en ajoutant dans tous les tubes, 1 ml du réactif (2+3) v/v, et 0,5 du réactif 4, on mélange puis on laisse la coloration se développer à l'obscurité pendant 10 minutes. On effectue ensuite la lecture de la DO à 510 nm en réglant le

zéro par le tube témoin. Pour déterminer la concentration du phénol libéré on utilise une gamme étalon obtenue avec une solution du phénol de 2mM, qui permet de convertir les valeurs de DO en concentration du phénol.



**Figure 4** : Courbe d'étalonnage du phénol

#### Calcul de $\epsilon$

D'après la loi de Beer-Lambert

$$DO = \epsilon \cdot L \cdot C \quad ; \text{ avec } L=1 \text{ et } \epsilon : \text{ coefficient d'extinction molaire}$$

$$\epsilon = DO / C$$

$$\epsilon = \Delta DO / \Delta C$$

$$\epsilon = (1,80 - 0,9) / (0,4 - 0,2) \cdot 10^{-3}$$

$$\epsilon = 4500 \text{ A.M}^{-1}$$

#### Calcul de l'activité PA

- › L'activité phosphatase acide est exprimée en  $\mu\text{mol/l}$  du phénol libéré par min dans le milieu réactionnel.

$$V_i = [\text{phénol}] / t ; \text{ avec } [\text{phénol}] = DO / \epsilon, t : \text{ temps d'incubation}$$

- › L'activité phosphatase acide totale est exprimée en  $\mu\text{mol/l}$  du phénol libéré par min dans l'extrait enzymatique.

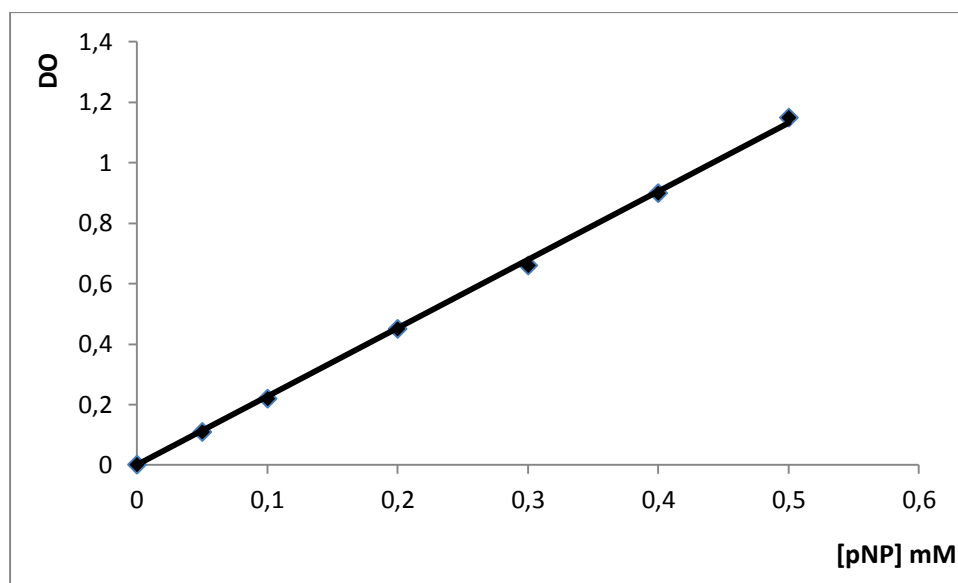
$$V = ([\text{phénol}] / t) \cdot (V_f / V_{int}) ; \text{ Avec } V_{int}: \text{ volume initiale du gel utilisé, } V_f : \text{ volume final de milieu réactionnel}$$

- L'activité spécifique obtenue est exprimée en  $\mu\text{mole}$  du phénol libéré par min et par g de matière fraîche.

$$V_s = V_i / [\text{MF}] \text{ avec ; MF: matière fraîche}$$

#### ➤ Pour le pNPP

Après l'arrêt de la réaction par l'ajout de NaOH 0.5 N, on laisse la coloration se développer à l'obscurité pendant 10 min, puis on dose la quantité du pNP libéré au spectrophotomètre à 410 nm. Les densités optiques sont converties en  $\mu\text{mole}$  du pNP libéré grâce à une gamme étalon obtenue avec une solution de pNP 1 mM.



*Figure 5: Courbe d'étalonnage du pNP.*

#### Calcul de $\epsilon$

D'après la loi de Beer-Lambert

$$DO = \epsilon \cdot L \cdot C \quad ; \text{ avec } L=1 \text{ et } \epsilon : \text{ coefficient d'extinction molaire}$$

$$\epsilon = DO / C$$

$$\epsilon = \Delta DO / \Delta C$$

$$\epsilon = (0,22 - 0,11) / (0,1 - 0,05) \cdot 10^{-3}$$

$$\epsilon = 2200 \text{ A.M}^{-1}$$

#### Calcul de l'activité PA

- L'activité phosphatase acide est exprimée en  $\mu\text{mol/l}$  du pNP libéré par min dans le

milieu réactionnel.

$$V_i = [\text{pNP}] / t \quad \text{avec } [\text{pNP}] = \text{DO} / \epsilon$$

- L'activité phosphatase acide totale est exprimée en  $\mu\text{mol/l}$  du pNP libéré par min dans l'extrait enzymatique.

$$V = ([\text{pNP}] / t) * (V_f / V_{\text{int}})$$

- L'activité spécifique obtenue est exprimée en  $\mu\text{mole}$  du pNP libéré par min et par g de matière fraîche.

$$V_s = V_i / [\text{MF}]$$

### 3. Variation de l'activité phosphatase acide *in vivo* dans différentes parties d'une feuille d'*Aloe vera*

On étudie l'activité PA au niveau de différentes parties d'une feuille d'*Aloe vera* ; partie basale (5, 6), médiane (1, 2, 3, 4) et apicale (0), en présence du phényl-phosphate disodique à concentration constante 20 mM, en milieu tamponné pH=5 et thermostaté à 37°C on incube pendant 30 min.



**Figure 6 :** Différentes parties d'une feuille d'*Aloe vera* ; partie basale (5, 6), médiane (1, 2, 3, 4) et apicale (0)

**N.B :** toutes les expériences ci-dessous sont effectuées en utilisant la méthode *in vivo*, et les morceaux du gel ont été prélevés à partir d'un même endroit de la feuille.

#### 4. Cinétique enzymatique en fonction du temps d'incubation

On opère en présence d'enzyme et du phényl-phosphate disodique à concentration constante 20 mM, en milieu tamponné pH=5 et thermostaté à 37°C. On fait varier le temps de contact entre le substrat et l'enzyme (15, 30, 45, 60 et 120 min).

#### 5. Détermination des paramètres cinétiques de la phosphatase acide

On étudie l'influence de la concentration du substrat afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme ( $K_m$  et  $V_m$ ) en employant des concentrations du substrat variant de 1 à 50 mM. L'incubation se fait à 37 °C pendant 30 min en présence d'enzyme à concentration constante, en milieu tamponné pH=5 et thermostaté à 37°C.

## **6. Effet de la concentration d'enzyme**

On réalise l'expérience en utilisant des concentrations d'enzyme différentes en variant la quantité du gel prélevée ; 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, et 0.4 g / 1.2 ml. L'incubation se fait à 37 °C en milieu tamponné pH=5 pendant 30 min.

## **7. Variation de l'activité phosphatase acide en fonction de l'âge des feuilles**

Pour étudier ce paramètre, on utilise cinq feuilles d'*Aloe vera* d'âges différents numérotées de 1 à 5 de haut vers le bas (figure 7). Pour chaque feuille on mesure l'activité enzymatique dans un milieu réactionnel composé de 500  $\mu$ l du tampon citrate pH 5 et 500 $\mu$ l du phényl-phosphate disodique 20 mM. L'incubation se fait au bain marie à 37°C pendant 30 min.



*Figure 7: Cinq feuilles d'Aloe vera d'âges différents numérotées de 1 à 5 de haut vers le bas*

## **8. Caractéristiques physico-chimiques de la phosphatase acide**

### **a. Effet de pH**

On mesure l'activité phosphatase acide en présence du phényl-phosphate disodique 20 mM, dans deux valeurs du pH, l'une acide (pH=5) en utilisant le tampon citrate pH 5, et l'autre basique (pH=11) avec NaOH pH 11.

### **b. Effet de température**

La température optimale d'hydrolyse est déterminée en mesurant l'activité dans le tampon citrate pH 5 en présence du phényl-phosphate disodique 20 mM, on incube pendant 15 min à des températures comprises entre 0 et 100 °C.



# Partie III :

## Résultats et discussion

---

L'extrait ou les morceaux du gel des feuilles d'*Aloe vera* sont incubés en présence d'un ester phosphorique dans des conditions de pH et de température. On dose le produit libéré dans le milieu réactionnel par méthodes colorimétriques.

### 1. Test enzymatique et spécificité du substrat

Pour tester la présence de l'activité enzymatique dans le gel des feuilles, on a étudié la spécificité de la phosphatase acide de deux substrats différents le pNPP et le phényl-phosphate disodique.

**Tableau 2:** Spécificité de la phosphatase acide.

Substrats	Phényl-phosphate disodique	pNPP
Activité phosphatase acide (µM/min)	4.22	19.69

Le tableau 2 montre la présence d'une activité phosphatase acide dans le gel des feuilles d'*Aloe vera*. La PA peut hydrolyser deux substrats, et l'activité sur le pNPP est 5 fois plus élevée que sur le Phényl-phosphate disodique.

Ces résultats montrent que le pNPP est le substrat le plus hydrolysé par la phosphatase acide par rapport au phényl phosphate disodique.

### 2. Comparaison de la méthode *in vivo* et *in vitro*

Pour tester l'activité enzymatique dans le gel des feuilles jeunes et adultes, on a comparé deux méthodes de dosage; la première en utilisant l'extrait enzymatique (*in vitro*) et la deuxième; des morceaux du gel (*in vivo*). Le substrat employé est le phényl-phosphate disodique.

**Tableau 3:** Activité phosphatase acide *in vitro* et *in vivo* dans le milieu réactionnel contenant le phényl- phosphate disodique

Méthode	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>	
	Jeune	Adulte	Jeune	Adulte
Activité phosphatase acide (µM/min)	8,88	3,92	14,07	6,07

Le tableau 3 montre que la PA est active dans les feuilles jeunes et adultes. La méthode *in vivo* donne les meilleurs résultats avec une activité 2 fois plus élevée que celle obtenue avec la méthode *in vitro*. L'activité PA paraît plus élevée dans les feuilles jeunes, pour cela on opté

pour l'étude de l'effet de l'âge ainsi que la variation de l'activité PA dans les différentes parties de la feuille.

Pour cela on a utilisé la méthode *in vivo* dans les expériences qui suivent.

### 3. Variation de l'activité phosphatase acide *in vivo* dans différentes parties d'une feuille d'*Aloe vera*

Afin de différencier l'activité phosphatase acide d'une partie à une autre, une étude s'est réalisée sur les trois parties de la feuille; partie basale, médiane et apicale. Les valeurs figurant sur le tableau représentent la moyenne de trois répétitions.

**Tableau 4:** *Activité phosphatase acide dans le milieu réactionnel in vivo dans différentes parties d'une feuille d'Aloe vera*

Partie	Apical	Médiane				Basale	
Numéro de la Partie	0	1	2	3	4	5	6
Activité phosphatase acide ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	21,04	7,63	10,96	9,48	9,93	12,15	12,67
La moyenne de l'activité PA ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	21,04	9,5				12,41	

Le tableau 4 indique que l'activité PA au niveau de la partie basale est de  $12,41\mu\text{M}/\text{min}$ ;  $9,5\mu\text{M}/\text{min}$  au niveau de la partie médiane et  $21,04\mu\text{M}/\text{min}$  dans la partie apicale, de ce fait nous relevons que l'activité PA est maximale dans la partie apicale. Ceci peut être expliqué par le fait qu'au niveau de la partie apicale se situe le méristème où ont lieu les divisions cellulaires, il se caractérise par la présence des cellules jeunes dont le métabolisme est actif et donc une activité enzymatique plus importante.

### 4. Variation de l'activité phosphatase acide en fonction de l'âge des feuilles

Dans l'optique de montrer l'effet de l'âge des feuilles sur l'activité PA, une expérience sur cinq feuilles d'âge différents numérotées de 1 à 5 du haut vers le basa été réalisée. Les résultats représentent la moyenne des activités PA de trois prélèvements de la partie basale de chaque feuille.

**Tableau 5:** Activité PA en  $\mu\text{M}/\text{min}$  de 5 feuilles d'Aloe vera de différents âges

Feuille	1	2	3	4	5
Activité PA ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	22	18	13,67	11,33	7,67

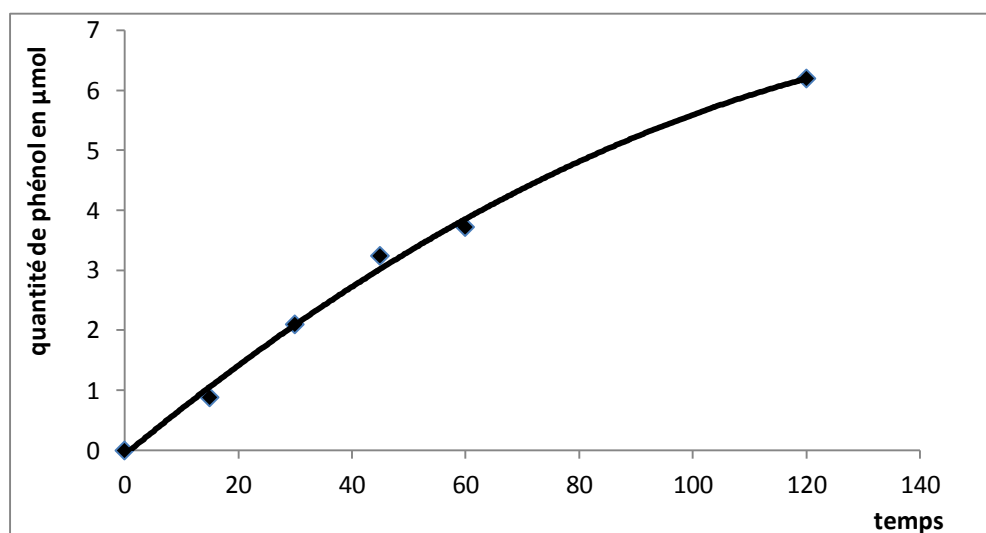
Le tableau 5 montre que plus la feuille est jeune plus l'activité PA est élevée, ceci est dû au fait que les feuilles jeunes sont formées de cellules jeunes où le métabolisme est très actif et donc l'activité enzymatique plus élevée.

### 5. Cinétique enzymatique en fonction du temps d'incubation

On détermine la quantité de phénol libérée pour différents temps d'incubation (15, 30, 45, 60, 120 min) pour une concentration de substrat de 20 Mm.



**Figure 8:** Illustration des résultats obtenus pour la cinétique enzymatique en fonction du temps d'incubation



**Figure 9:** Cinétique enzymatique en fonction du temps

$V_i$  est la pente de la courbe  $P = f(t)$  pendant la phase linéaire. Cette phase dure environ 30 min.

$$V_i = \Delta P / \Delta t$$

$$V_i = (2,1 - 0,88) / (30 - 15)$$

$$V_i = 0,081 \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$V_i = 6,75 \mu\text{M}/\text{min}$$

La figure 9 représente l'évolution de la quantité du produit en fonction du temps, elle montre que la quantité du produit libéré augmente rapidement durant la première heure jusqu'à atteindre  $3,72 \mu\text{mole}/\text{min}$  au-delà, la quantité du phénol libéré continue à augmenter mais de façon moins importante. Ceci peut être dû à l'épuisement du substrat à cause de sa transformation en produit.

## 6. Détermination des paramètres cinétiques de la phosphatase acide

On fait agir une concentration fixe d'enzyme sur des concentrations variables de substrat qui sont préparées par dilution successives de la solution fille de phényl-phosphate disodique 50mM.



Figure 10 : Illustration des résultats obtenus pour la cinétique enzymatique en fonction de la concentration du substrat

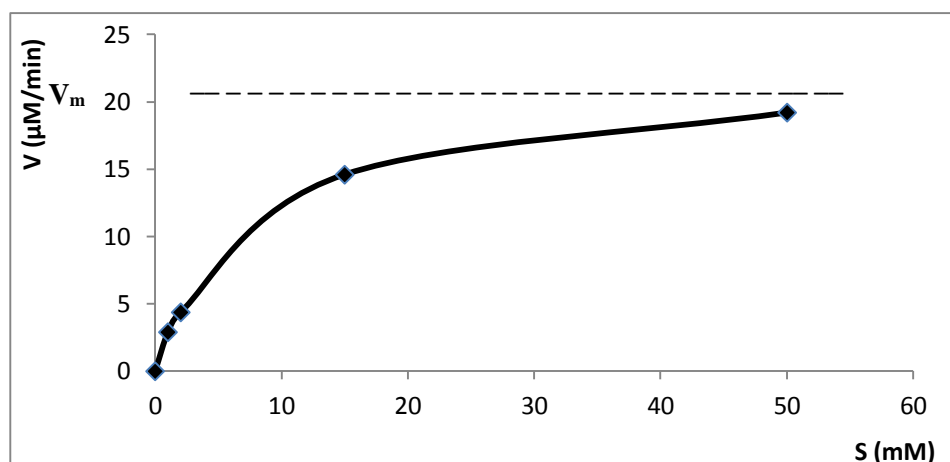
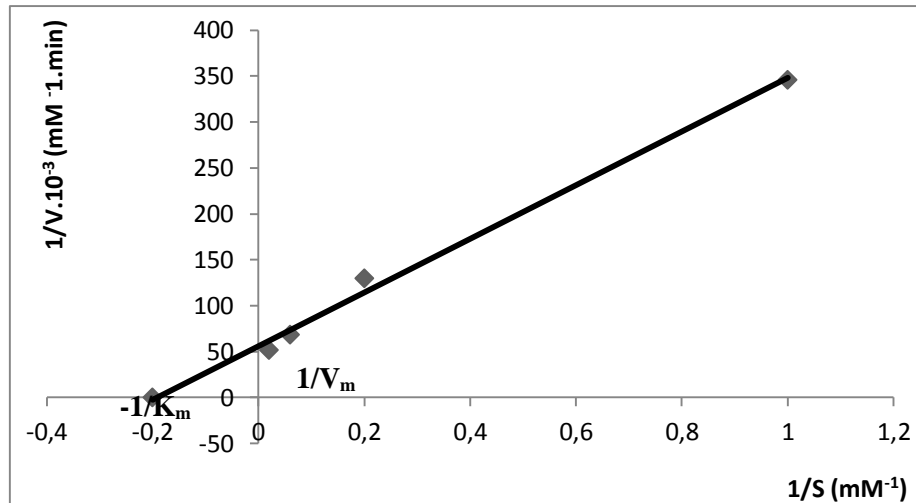


Figure 11: Courbe de Michaelis-Menten représentant  $V_i = f([S])$

A la lumière des résultats obtenus, on note que plus la concentration de substrat augmente plus la vitesse initiale augmente jusqu'à moment où elle se stabilise.

Au vue de ces résultats, il apparaît que la concentration de substrat influe sur la vitesse initiale. La stabilité de  $V_i$  est une traduction de la saturation de l'enzyme par le substrat.



**Figure 12:** Courbe de Lineweaver-Burk représentant  $1/V = f(1/[S])$

A partir de la courbe de Lineweaver-Burk on détermine les paramètres cinétiques de la PA:

- $K_m = 5\text{mM}$
- $V_m = 20 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

## 7. Effet de la concentration d'enzyme

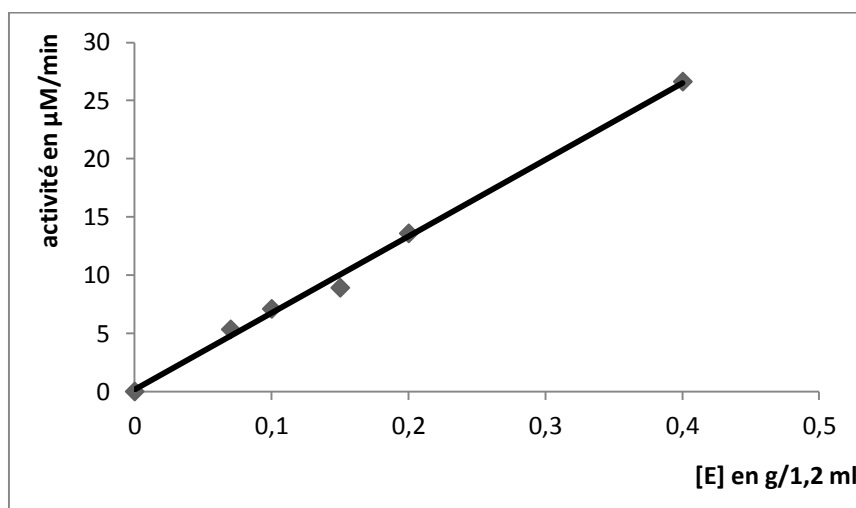
On utilise 5 concentrations d'enzyme différentes, en variant la masse du gel ; 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.4 g du gel par 1.2ml du milieu réactionnel, et on détermine la quantité du phénol libérée pour chaque concentration.



**Figure 13 :** Illustration des résultats obtenus pour la cinétique enzymatique en fonction de la  $[E]$

**Tableau 6:**Activité phosphatase acide en fonction de la concentration d'enzyme

[E](g de MF/l)	58,3	83,3	125	166,6	333,2
Activité PA ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	5,33	7,1	8,9	13,56	26,6
Activité PA spécifique ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de MF)	0,09	0,09	0,07	0,08	0,08



**Figure 14:** Cinétique enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme

La figure 14 montre que l'activité PA est proportionnelle à la concentration d'enzyme, ceci peut être justifié par la relation  $V_i = k[E]$  et puisque  $k$  est constante donc  $V_i$  est proportionnelle à la concentration d'enzyme.

Le tableau 6 montre que l'activité PA spécifique est constante quel que soit la concentration de l'enzyme.

## 8. Caractéristiques physico-chimiques de la phosphatase acide

### a. Effet de pH

On a mesuré l'activité PA à deux valeurs de pH différentes 5 et 11. Le prélèvement étant effectué à partir d'une feuille adulte (feuille 4) au niveau de la partie basale.

**Tableau 7 : Activité PA à deux valeurs de pH différentes 5 et 11**

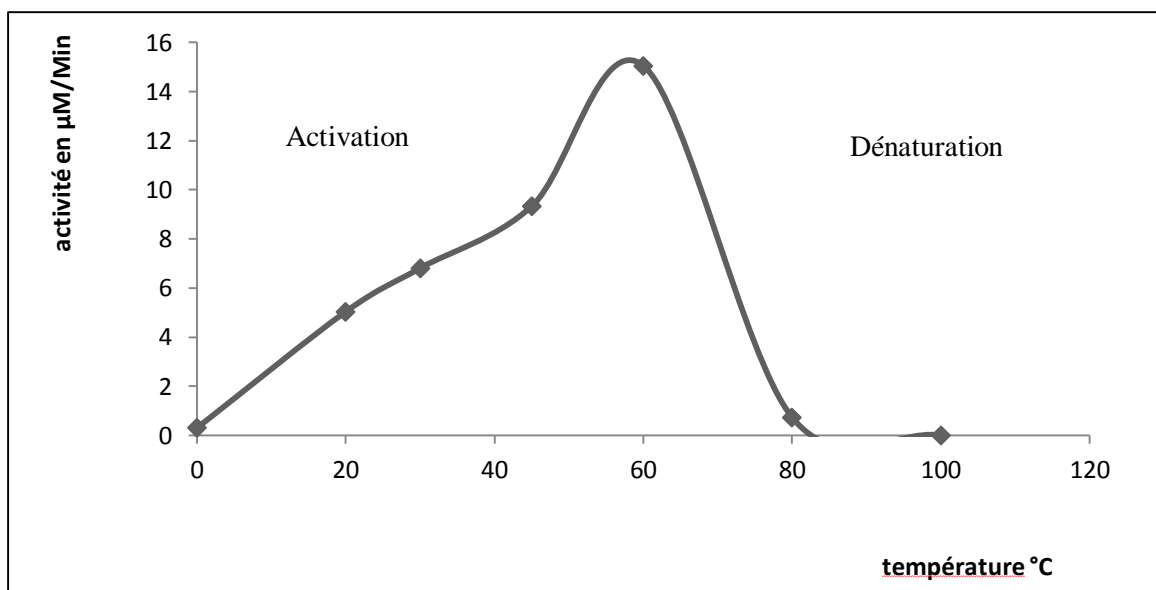
pH	5	11
Activité phosphatase acide ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	11,85	0

D'après le tableau 12, on note qu'à pH=5, l'activité PA est maintenue, alors qu'elle est absente à pH=11.

La phosphatase acide est une enzyme qui fonctionne à pH acide (4à6). L'absence d'activité au pH basique s'interprète par le changement d'ionisation des acides aminés du site actif de l'enzyme. Quand les charges des chaînes latérales des acides aminés sont modifiées, pour des pH plus éloignés de la valeur optimale, la structure de l'enzyme est modifiée, et en perdant sa conformation, l'enzyme perd son activité catalytique.

### **b. Effet de la température**

L'activité enzymatique est mesurée en fonction de la température, en présence de substrat (20 mM) et à pH = 5.



**Figure 15: Effet de la température sur l'activité de la phosphatase acide**

D'après les résultats, on constate que :

- À  $T^{\circ}=0^{\circ}\text{C}$  : absence d'activité PA car l'enzyme est inactive
- À  $0^{\circ}\text{C} < T^{\circ} < 60^{\circ}\text{C}$  : l'activité PA augmente avec l'augmentation de la température, donc la température intervient dans l'activation de l'enzyme.



- À  $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$  : l'activité PA est maximale.
- À  $T^{\circ}>60^{\circ}\text{C}$  : une diminution brutale de l'activité PA est observée.
- À  $80^{\circ}\text{C} < T^{\circ} < 100^{\circ}\text{C}$  : l'activité PA est nulle, cela est dû à la dénaturation de l'enzyme.

Les résultats obtenus montrent que la température optimale de la PA est  $60^{\circ}\text{C}$

La température augmente la vitesse enzymatique puisque l'interaction entre l'enzyme et son substrat devient plus importante à forte température. Nous constatons que la vitesse augmente d'une façon exponentielle avec la température. Mais, l'enzyme est une protéine et à partir d'une certaine température sa conformation se modifie. A fortes températures la protéine se dénature et perd donc son activité enzymatique.

## Conclusion

Notre étude a permis de révéler la présence, dans les feuilles d'*Aloe vera* qui est une plante médicinale, d'une phosphatase acide caractérisée par :

- $K_m = 5 \text{ mM}$
- $V_m = 20 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$
- Une température optimale de  $60^\circ\text{C}$ .
- pH optimal de 5

La PA hydrolyse deux substrats (le pNPP et le Phényl-phosphate disodique). Son activité sur le pNPP est la plus élevée.

L'activité de cette enzyme est plus importante dans la partie apicale de la feuille quel que soit son âge. En plus cette activité est plus importante dans les feuilles jeunes. La partie apicale d'une part et les feuilles jeunes d'autre part contiennent des cellules méristématiques où le métabolisme est très actif ce qui explique l'activité phosphatase acide plus élevée.

Ce stage m'a été très bénéfique car il m'a permis de mettre à profit et d'élargir mon champ de connaissance surtout en enzymologie et par-dessus tout, d'avoir un aperçu du vaste monde de la recherche.

## Perspectives

Réaliser une purification de l'enzyme afin d'étudier les caractéristiques moléculaires.

## Références bibliographiques

1. Eugène Jean Parfait Kouadio et al. 10 avril 2006. Purification et caractérisation de deux phosphatases acides du tubercule de taro (*Xanthosoma sp.*) Et leur rôle dans la conservation post-récolte.
2. Eugène Jean Parfait KOUADIO et al. le 02 April 2009. Les rhizomes des Zingibéracées *Zingiber officinale* et *Curcuma domestica* : de potentielles sources de phosphatases acides thermostables.
3. Natacha MICHAYEWICZ Le 29 octobre 2013. L'*Aloe vera*, plante médicinale traditionnellement et largement utilisée depuis des millénaires, aux nombreuses propriétés thérapeutiques. Plante miracle ?
4. Emmanuel MORIN le 27 octobre 2008. *Aloe vera* (L.) Burm.F. : Aspects pharmacologiques et cliniques.
5. Wikipédia.
6. « L'Aloès pour votre santé » du Docteur Yves Don adieu, *Aloe vera*, Remède naturel de légende d'Alain Barcroft et Aloès, la plante qui guérit de Marc Schweizer.  
  
<http://www.aloemagazine.com/composition-aloe-vera/>
7. Osmoselr Le 11/06/2012. Propriétés de la pulpe de l'*Aloe vera*.
8. Emmanuelle Le Pihive le 9 Mars 2009 Evaluation du rôle de la phosphatase acide AcpA dans la Virulence de *Francisella tularensis*.
9. Alphonse KAMENAN le 24 mai 1984 Purification et études physico-chimiques de trois phosphatases acides de *Dioscorea cayenensis rotundata*.