

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|------------------------|---------------------------------------|
| C | : concentration |
| DO | : densité optique |
| E | : Enzyme |
| K_m | : constante de Michaelis |
| L | : la longueur de la cuve |
| MF | : matière fraîche |
| PA | : phosphatase acide |
| pH | : potentiel d'hydrogène |
| pNP | : paranitrophénol |
| pNPP | : paranitrophénylphosphate |
| S | : Substrat |
| t | : temps d'incubation |
| T° | : température |
| V_f | : volume final |
| V_i | : vitesse initiale |
| V_{int} | : volume initiale |
| V_m | : vitesse maximal |
| V_s | : activité spécifique |
| V_t | : activité totale |
| ε | : coefficient de d'extinction molaire |

Liste des figures

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

Liste des tableaux

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

| | |
|---|-----------|
| Introduction..... | 1 |
| Partie I : Revue bibliographique | |
| I. <i>Aloe vera</i> | 2 |
| 1. Généralités..... | 2 |
| 2. Répartition géographique..... | 2 |
| 3. Description botanique..... | 2 |
| 3.1. Aspect général..... | 2 |
| 3.2. Feuille..... | 3 |
| 3.3. Coupe transversale..... | 3 |
| 3.4. Caractéristiques du gel..... | 4 |
| 4. Composition chimique..... | 4 |
| 5. Vertus thérapeutiques..... | 7 |
| 6. Effet secondaire..... | 8 |
| II. La phosphatase acide..... | 8 |
| Partie II. Matériel et méthodes | |
| I. Matériels..... | 9 |
| 1. Matériel biologique..... | 9 |
| 2. Réactifs..... | 10 |
| II. Méthode..... | 11 |
| 1. Prélèvement du gel..... | 11 |
| a. Méthode <i>in vitro</i> | 11 |
| b. Méthode <i>in vivo</i> | 11 |
| 2. Technique de mesure de l'activité phosphatase acide | 11 |
| 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 feuilles..... | 15 |
| 8. Caractéristiques physico-chimiques de la phosphatase acide..... | 15 |
| a. Effet de pH..... | 15 |
| b. Effet de température..... | 15 |
| Partie III. Résultats et discussion | |
| 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 |
| Conclusion | 24 |
| Référence bibliographique..... | |

Introduction générale

Les phosphatases acides (EC. 3.1.3.2, orthophosphoric –monoester phosphohydrolase) forment un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de liaisons esters phosphoriques avec libération de phosphates inorganiques (Pi) dans un environnement acide autour de pH 6,0 selon la réaction suivante :



Elles ont été étudiées aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal et microbien. Chez les végétaux, les phosphatases acides ont été purifiées et caractérisées au niveau des tubercules, des graines, des feuilles, des racines et des bulbes. Elles semblent jouer des rôles très importants dans l'hydrolyse des monoestres phosphoriques et le transfert des groupements phosphates. (Kouadio EJP *et al.*, 2006)^[1].

Les phosphatases acides des racines semblent être impliquées 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)^[2].

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 d'autre part dans l'hydrolyse des pesticides phosphorés, montrant ainsi l'intérêt actuel de ces enzymes. (Kouadio EJP *et al.*, 2009)^[2].

Par ailleurs, de nos jours, les phosphatases acides ont des applications dans des domaines tels que 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)^[2].

Nous nous intéresserons à l'*Aloe barbadensis Miller*, plus communément appelée *Aloe vera*, qui est de loin l'espèce la plus répandue dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique et agro-alimentaire.

Dans ce travail nous avons étudié la présence possible d'activité phosphatase acide dans les feuilles d'*Aloe Vera* en vue de caractériser cette enzyme au niveau de cette plante, et étudier ses propriétés physico-chimiques.

Notre déroulé se déroule comme suit:

- ❖ **Revue bibliographique**
- ❖ **Matériel et méthodes**
- ❖ **Résultats et discussion**
- ❖ **Conclusion**

Partie I :
Revue bibliographique

I. *Aloe vera*

1. Généralités

L'*Aloe* est une plante succulente vivace, très souvent confondue à tort avec l'Agave, elle appartient, selon les classifications, soit à la famille des *Xantorheaceae* soit à la famille des *Aloeaceae*. Elle fait partie des 420 espèces des aloès et elle est reconnue pour ses propriétés thérapeutiques. (Natacha MICHAYEWICZ, 2013)^[3].

Utilisée depuis l'Antiquité dans des régions du monde éloignées les unes des autres, elle possède de nombreux surnoms qui laissent présager son important potentiel thérapeutique : Les Africains la surnomment « Lys du désert », les Indiens « Bâton du ciel », les Egyptiens « Plante de l'Immortalité », les Américains « Docteur aloès », les Russes « Plante divine », les Européens « Plante miracle ». (MICHAYEWICZ. N, 2013)^[3].

Christophe Colomb en parle alors dans ses journaux de bord et l'appelle le « docteur en pot ». Il dit : « Quatre végétaux sont indispensables à la vie de l'Homme : le blé, la vigne, l'olivier et l'aloès. Le premier te nourrit, le second te réjouit, le troisième t'harmonise et le quatrième te guérit »^[4].

2. Répartition géographique

L'*Aloe vera* est originaire de l'Afrique du Sud et de l'Est. Elle est présente essentiellement dans les régions désertiques d'Asie et d'Amérique, notamment aux Antilles et en Amérique du Sud^[3].

3. Description botanique

3.1. Aspect général



Figure 1 : Plante d'*Aloe Vera*

L'*Aloe vera*, ou *Aloe barbadensis* Miller, est une petite plante grasse arbustive à aspect de rosettes larges à feuilles épaisses et juteuses. Cette plante arborescente d'environ 80 cm de haut, aux racines courtes et peu profondes, dont la tige très courte, robuste et ligneuse, porte un faisceau de feuilles charnues, de forme lancéolée à section triangulaire et aux extrémités pointues, qui sont disposées en rosette (les jeunes feuilles poussant au milieu et les plus vieilles étant à l'extérieur). La couleur de la plante est d'un vert clair tacheté de vert très clair, aux contours délicats, et elle est parfois parsemée de points roses pendant les périodes froides. Elle n'a pas de tronc, mais c'est un arbrisseau où 12 à 30 feuilles se ramifient dès la base ^[4,5].

3.2. Feuilles

Les feuilles charnues, lisses à cuticule épaisse, d'une très belle couleur verte lorsqu'elles sont indirectement au soleil, atteignent 80 cm de long et 10 cm dans leur plus grande largeur, avec des bords munis d'épines jaune clair (MORIN. E, 2008) ^[5]. La face supérieure de la feuille est plate ou légèrement concave, la face inférieure est fortement convexe (BENSEGUENI, 2001) ^[6].

3.3. Coupe transversale

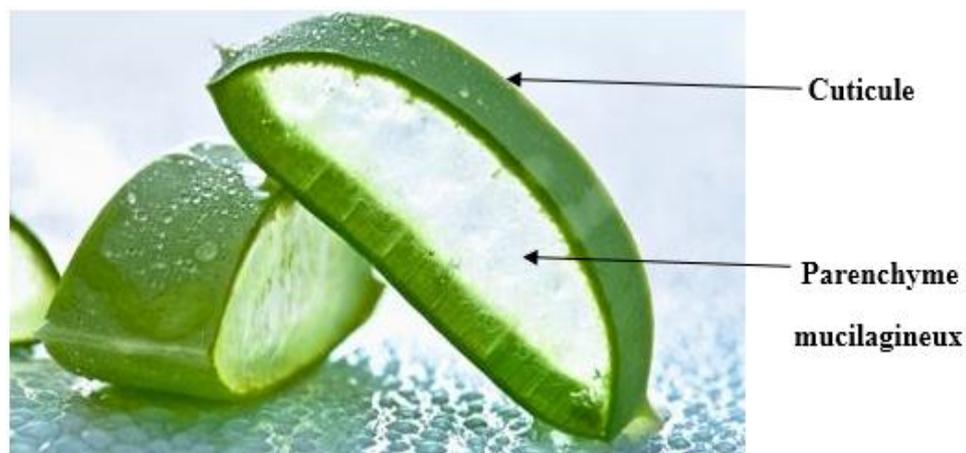


Figure 2 : Coupe transversale d'une feuille d'*Aloe vera*

La coupe transversale de la feuille permet de distinguer successivement, en allant de l'extérieur vers l'intérieur:

- la cuticule
- une couche épidermique chlorophyllienne
- un derme cellulosique dans lequel circule une sève (ou suc) rouge brunâtre, substance très amère

- au centre, la pulpe proprement dite, parenchyme mucilagineux incolore très épais qui contient le fameux gel, partie la plus riche et la plus active de la plante. (MICHAYEWICZ .N, 2013) [3].

3.4. Caractéristiques du gel

Les caractéristiques principales du gel sont :

- Son aspect visqueux
- Absence de couleur ; transparent
- L'absence d'odeur
- Son goût légèrement amer (MORIN. E, 2008) [5].

4. Composition chimique

Eau

Avant toute chose il est bien de noter que le principal constituant des aloés est l'eau. La cuticule contient approximativement 90 % d'eau et le gel en contient entre 98,5% et 99,5%. Par conséquent, la matière sèche représente moins de 1 % du poids sec de la plante et est constituée à plus de 60 % par les polysaccharides.

Cependant, suivant les saisons et la disponibilité de l'eau, la composition chimique de ces plantes subit des fluctuations.

La composition chimique est largement dépendante des espèces analysées. Cette composition des aloés et en particulier de l'*Aloe vera* est complexe. De nombreux investigateurs ont cherchés à l'établir et la littérature liste une multitude de principes actifs et de composants. (MORIN. E, 2008) [5].

Les vitamines

On trouve de nombreuses vitamines dont :

La vitamine A ou rétinol: essentielle pour la vision, la multiplication cellulaire et les trophicités épithéliale et tissulaire.

La vitamine B1 ou thiamine: elle joue un rôle métabolique essentiel, nécessaire au fonctionnement cellulaire et à la transmission de l'influx nerveux.

La vitamine B2 ou riboflavine: importante pour la santé de la peau et des tissus.

La vitamine B3 ou vitamine PP: aide à réguler le métabolisme.

La vitamine B6 ou pyridoxine: intervient comme coenzyme dans de nombreuses réactions, notamment celles qui impliquent les acides aminés.

La vitamine B9 ou acide folique: indispensable à la maturation des érythrocytes.

La vitamine B12: essentielle pour le maintien de l'intégrité du système nerveux et pour l'hématopoïèse. Rappelons que la vitamine B12 existe rarement dans les plantes.

La vitamine C ou acide ascorbique: stimule le système immunitaire et possède des propriétés anti-oxydantes.

La vitamine E ou tocophérol: agit comme agent antioxydant et au niveau de la synthèse de l'hème. (MICHAYEWICZ.N, 2013) [3].

Les minéraux

L'*Aloe vera* contient plus 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 [7].

Les acides aminés essentiels

Les acides aminés sont nécessaires à la synthèse des protéines, ils ont un rôle métabolique et peuvent jouer le rôle de neuromédiateurs. Le gel en contient 18, dont le plus abondant retrouvé est l'arginine puis l'acide glutamique.

Les acides aminés essentiels ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent donc être impérativement apportés par l'alimentation. Le gel d'*Aloe vera* contient 7 des 8 acides aminés dits essentiels. Il s'agit de l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine et la valine.

Les acides aminés secondaires ou non essentiels sont retrouvés au nombre de 11 (sur les 14 existants). Ils peuvent être synthétisés dans l'organisme à partir des lipides ou glucides. On

y trouve l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, l'arginine, la cystine, la glycine ou glycofolle, l'histidine, la proline, l'hydroxyproline, la sérine, et la tyrosine. (MICHAYEWICZ. N, 2013) [3].

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 [7].

Mono- et polysaccharides (glucides)

Cellulose, glucose, galactose, mannose, aldo-pentose, L-rhamnose, aloéride, arabinose, xylose [5, 3].

Les enzymes

Amylase: Catalyse hydrolyse de l'amidon en dextrine puis en maltose.

Bradykinase: Stimule le système immunitaire, analgésique, anti-inflammatoire.

Catalase: Évite l'accumulation de l'eau oxygénée dans les tissus.

Cellulase: Aide à digérer la cellulose.

Créatine phosphorique: Enzyme musculaire.

Lipase: Facilite la digestion.

Nucléotidase: Catalyse l'hydrolyse des nucléotides en nucléosides.

Phosphatase acide: Enzyme déphosphorylante.

Phosphatase alcaline: Régulateur des fonctions hépatiques.

Protéolytiase (ou protéase): Hydrolyse les protéines à l'intérieur de leur constituants [7, 5].

L'acémannane

Au cours des dernières décennies, des chercheurs isolèrent de nombreuses autres molécules actives dans l'*Aloe vera*, qui est spécialement riche en acémannane, qui opère en interaction avec le système immunitaire ; il augmente la production de macrophages, facteurs de l'élimination des tumeurs [7].

Acides gras

Tous insaturés et indispensables. L'un d'entre eux, l'acide caprylique, est utilisé dans le traitement des mycoses.

L'*Aloe vera* contient également de l'acide salicylique, de l'acide chrysophanique, des huiles volatiles, etc [7, 5].

Autres constituants

D'autres substances ont été découvertes dans le gel :

L'aloetine : est un germicide remarquable qui neutralise la toxicité de nombreux germes.

L'aloelucine : active la régénérescence cellulaire et accélère la guérison des ulcères.

L'aloesine : a une puissante action bactéricide

L'aloemicine : semble posséder une action anti-tumorale efficace dans le traitement de certaines cellules cancéreuses [7].

5. Vertus thérapeutiques

La pulpe de l'*Aloe vera* possède de très nombreuses propriétés fortes utiles à la santé, qui peuvent être classées sous 4 grandes familles :

➤ Dermatologiques

Hémostatique : processus qui permet d'interrompre le saignement.

Anesthésique et analgésique : suppression des sensations, en particulier la douleur.

Bactéricide: capacité de tuer des bactéries.

Cicatrisante: capacité de fermer et guérir les plaies.

Anti-inflammatoire: combattre et traiter une inflammation.

➤ Cosmétologiques

Astringente: substance qui resserre les tissus.

Adoucissante et Protectrice

Rééquilibre le pH de la peau

Desquame les cellules mortes de l'épiderme

Hydrate et nourrit la peau en profondeur

Stimule la multiplication cellulaire du derme

Lutte contre le vieillissement: stimule la production de collagène

Apaisante: adoucit, assouplit et apaise les tissus

➤ Nutritionnelles

L'*Aloe vera* possède des propriétés nutritionnelles dans le cadre de la complémentation alimentaire.

Apport en éléments vitaux : acides gras essentiels, vitamines, acides aminés, minéraux et oligoéléments

➤ Digestives

Pour une bonne digestion l'*Aloe Vera* agit favorablement sur tout le système digestif grâce à ses nombreuses enzymes. En augmentant la production d'enzymes digestives, elle rééquilibre la flore intestinale

6. Effets secondaires

Il n'existe pas de gènes ou d'effets secondaires liés à la consommation de gel d'*Aloe vera*. Il faut cependant être vigilant quant à la qualité du gel consommé [4].

II. La phosphatase acide

La phosphatase acide (PA) est une enzyme de la famille des hydrolases, très abondante dans de nombreux tissus végétaux et animaux. Elle catalyse la déphosphorylation des esters phosphoriques organiques. Les phosphatases acides sont classées parmi les nombreux enzymes connus des végétaux chlorophylliens. Un certain nombre d'entre eux existent à la fois dans le cytoplasme et aussi dans les membranes squelettiques des cellules. Les phosphatases acides des végétaux sont aussi localisées dans les peroxysomes elles sont dites acides car leur fonction enzymatique n'est maintenue que pour des valeurs de pH inférieur à 7 elle est complètement inhibée en milieu basique. Pour la plupart, le pH optimal d'activité est situé entre 4-6 [4]. Par convention les PA sont classées selon plusieurs paramètres à savoir le poids moléculaire, le comportement vis-à-vis des différentes molécules (inhibiteurs ou activateurs) et la spécificité de substrats (**Le Pihive., 2009**) [8].

Elles sont capables de catalyser l'hydrolyse de tout type de substrat phosphorylé : pNPP, AMP, ATP, Glucose-1-phosphate, Galactose-1-phosphate, Glucose-1,6-diphosphate, Glucose-6-phosphate, NADP, pyrophosphate, uridine-5'-phosphate glucose, uridine-5'-phosphate galactose, phytate de sodium, le phénylphosphate, le phénylphosphate-disodique et le fructose-1-phosphate, etc (**Kouadio EJP et al., 2006**) [1].

La phosphatase acide semblent impliqués dans :

- L'incorporation de phosphate inorganique et la solubilisation des macromolécules de phosphates organiques du sol. [8, 1,2]
- Les mécanismes de régulation métaboliques
- L'industrie des engrais pour la biodisponibilité du phosphate inorganique (Pi) qui est généralement sous forme organique dans les sols et des additifs alimentaires (**Kouadio EJP et al., 2009**) [2].

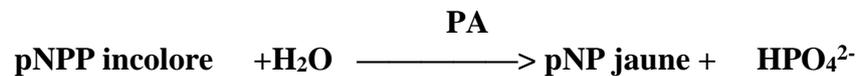
Partie II :
Matériel et méthodes

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 :

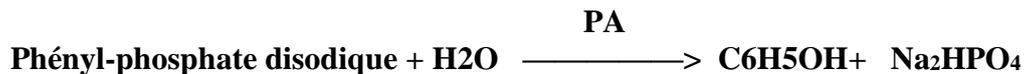


La difficulté essentielle consiste à trouver des substrats stables, qui ne s'hydrolysent pas spontanément. On s'est très vite orienté vers des substrats à noyau phénolique qui sont rapidement hydrolysés par des phosphatases.

- ✓ 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 410 nm.



- ✓ 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 [3].

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

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

2. Réactifs

- Substrats : On utilise l'un des deux substrats différents :
 - Le pNPP (Para-Nitrophényl phosphate)
 - 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 distilléeq.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'aminopyrine :
 - Aminopyrine.....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.

c. Méthode *in vitro*

Dans un mortier préalablement refroidi, le gel récupéré est broyé, puis additionné de 2 ml 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.

d. 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 0.2 g 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 2 mM, qui permet de convertir les valeurs de DO en concentration du phénol.

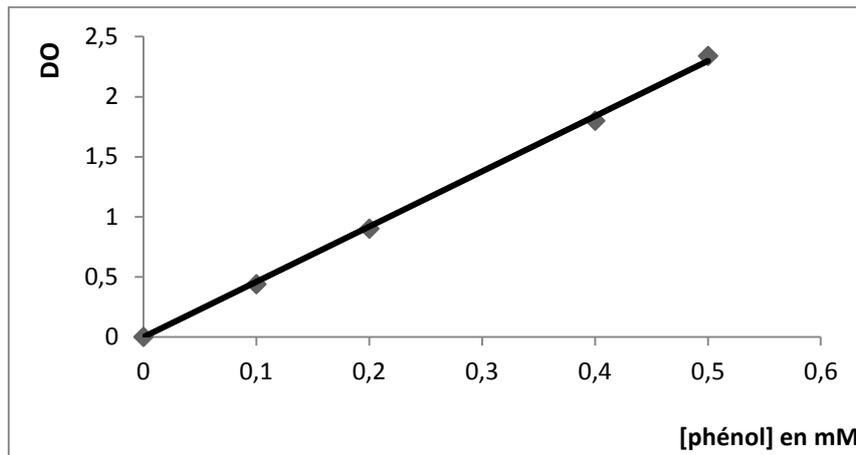


Figure 4 : Courbe d'étalonnage du phénol

Calcul de ϵ

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 μmole 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 μmole du pNP libéré grâce à une gamme étalon obtenue avec une solution de pNP 1 mM.

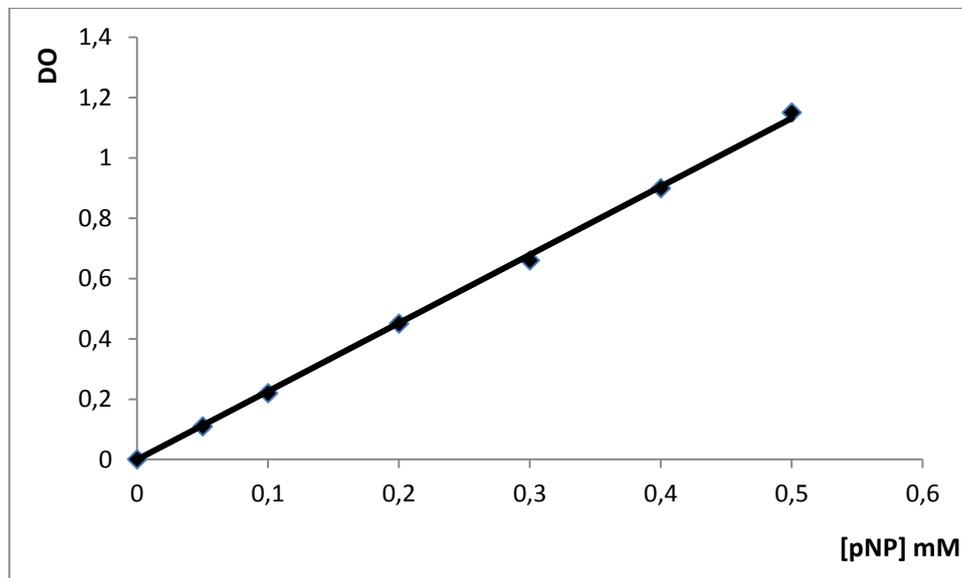


Figure 5: Courbe d'étalonnage du pNP.

Calcul de ϵ

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.

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

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

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

- L'activité spécifique obtenue est exprimée en μmole 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 µl du tampon citrate pH 5 et 500µl 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 a 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 bas a 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

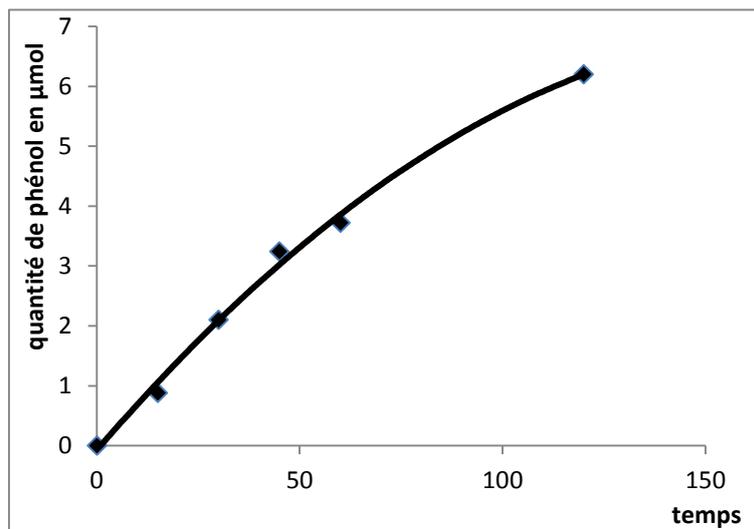


Figure 9: Cinétique enzymatique en fonction du temps

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

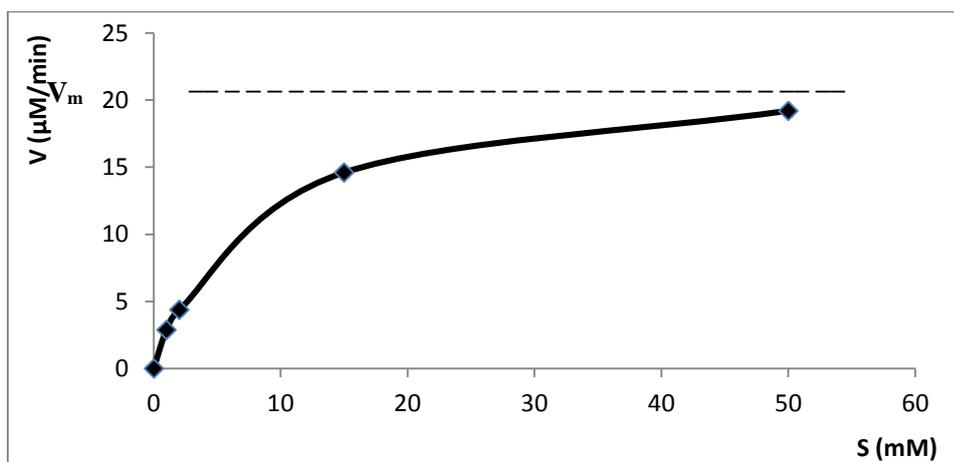


Figure 11: Courbe de Michaelis-Menten représentant $V_i = f([S])$

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.

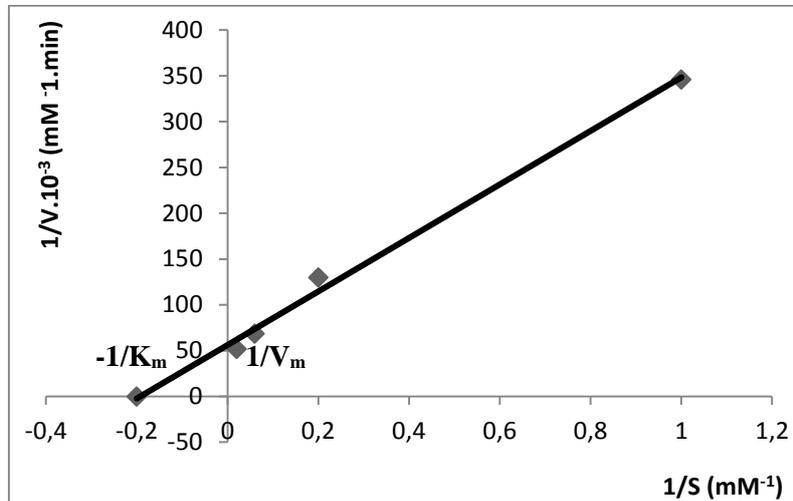


Figure 12: Courbe de Lineweaver-Burk représentant $1/V = f(1/[S])$

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 1,2 ml 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 |

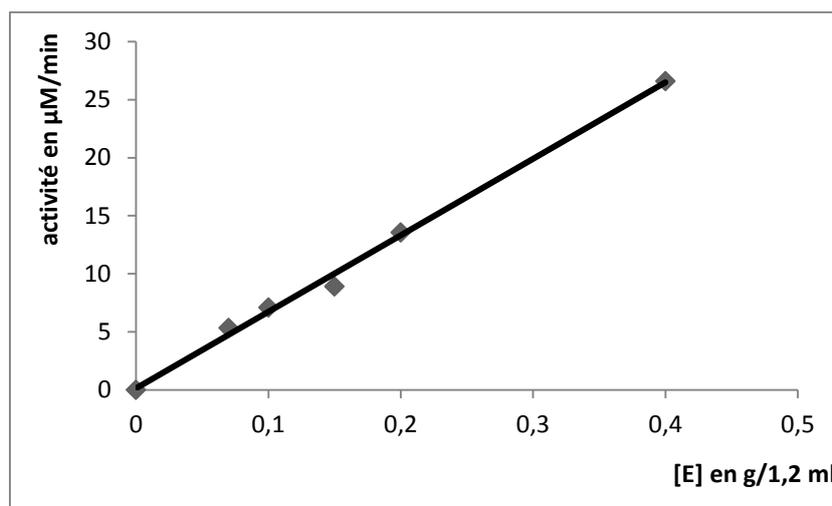


Figure 14: Cinétique enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme

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.

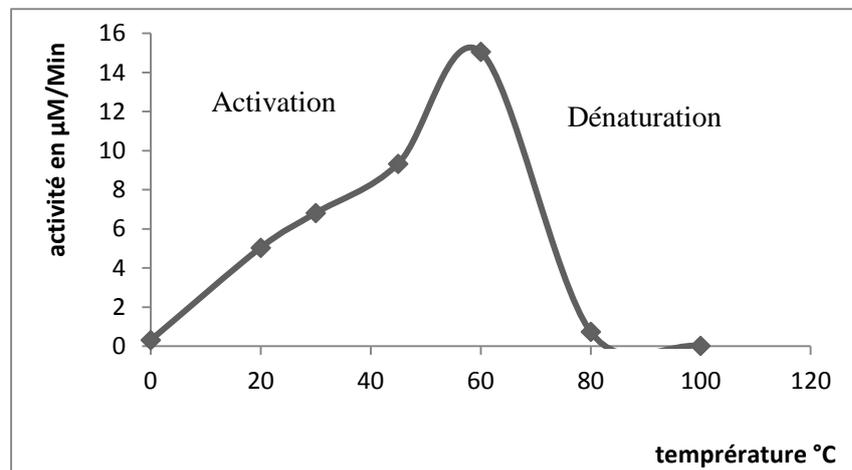


Figure 15: Effet de la température sur l'activité de la phosphatase acide

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°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 :

- $K_m = 5 \text{ mM}$
- $V_m = 20 \text{ } \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$
- une température optimale de 60°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, le 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'Aloevera, plante médicinale traditionnellement et largement utilisée depuis des millénaires, aux nombreuses propriétés thérapeutiques. Plante miracle ?
4. Wikipédia
5. Emmanuel MORIN LE 27 OCTOBRE 2008. Aloevera (L.) Burm.F. : Aspects pharmacologiques et cliniques
5. Osmoselr Le 11/06/2012. Propriétés de la pulpe de l'Aloevera
6. Bensegueni _ Tounsi Lynda 2001 Etude in « vitro » de l'effet antibactérien et antifongique de : *Inula viscosa* _ *Lawsonia inermis* _ *Asphodelus microcarpus* _ *Aloe vera* _ *Juniperus oxycedrus*
7. « L'Aloès pour votre santé » du Docteur Yves Don adieu, Aloevera, Remède naturel de légende d'Alain Barcroft et Aloès, la plante qui guérit de Marc Schweizer.
<http://www.aloemagazine.com/composition-aloe-vera/>
8. Emmanuelle Le Pihive le 9 Mars 2009 Evaluation du rôle de la phosphatase acide AcpA dans la Virulence de *Francisella tularensis*.