

**RAKOTOARISOA Tsirahonananarivo**

**CONTRIBUTION A L'ETABLISSEMENT DE LA MONOGRAPHIE DE  
*Aphloia theiformis*: DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE METHODE  
D'IDENTIFICATION**

**Thèse de Doctorat en Pharmacie**

**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO**  
**FACULTE DE MEDECINE**  
**DEPARTEMENT PHARMACIE**

**ANNEE : 2011**

**N° : 18**

**CONTRIBUTION A L'ETABLISSEMENT DE LA MONOGRAPHIE DE**  
***Aphloia theiformis* : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE METHODE**  
**D'IDENTIFICATION**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 26 Juillet 2011 à Antananarivo

Par

**Monsieur RAKOTOARISOA Tsirahonananarivo**

Né le : 04 Juin 1983 à Ambatomainty

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN PHARMACIE**

**(Diplôme d'Etat)**

**Directeur : Professeur RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothee**

**MEMBRES DU JURY :**

**Président : Professeur JEANNODA Victor**

**Juges : Professeur RATSIMALA RAMONTA Isabelle**  
**Professeur RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA**  
**Nantenaina Soa**

**Rapporteur : Docteur RAOELISON Emmanuel Guy**



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DE MEDECINE

☎/Fax : 22 277 04 - ✉ : BP. 375 Antananarivo  
E-mail : facultedemedecine\_antananarivo@yahoo.fr

## I. CONSEIL DE DIRECTION

### A. DOYEN

M. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa

### B. CHARGE DE MISSION

M. RAJAONARIVELO Paul

### C. VICE-DOYENS

- Appui à la Pédagogie et Recherche

M. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

- Relations Internationales

M. SAMISON Luc Hervé

- Sclolarité

\* 1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> cycles

M. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrana

\* 3<sup>ème</sup> Cycle court :

. stage interné, examen de clinique et thèses

M. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck

M. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA

Nantenaina Soa

- TéléEnseignement, Communication, LMD,  
Ecole Doctorale et Formation Continue

M. RAKOTO RATSIMBA Hery Nirina

- Troisième Cycle Long :

. Agrégation, Clinicat, Internat Qualifiant

M. SAMISON Luc Hervé

. Diplôme Universitaire, Diplôme InterUniversitaire

Mme. ROBINSON Annick Lalaina

### D. SECRETAIRE PRINCIPAL

- Responsable de l'Administration, Finances et  
Sécurité au travail

Mme. RASOARIMANALINARIVO Sahondra H.

## II. CONSEIL D'ETABLISSEMENT

### PRESIDENT

Mme. RAVELOMANANA RAZAFIARIVAO  
Noëline

## III. CHEFS DE DEPARTEMENT

- Biologie

Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat

- Chirurgie

Pr. RAVALISOA Marie Lydia Agnès

- Médecine

Pr. RANDRIA Mamy Jean de Dieu

- Mère et Enfant

Pr. RAOBIJAONA Solofoniaina Honoré

- Pharmacie

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA  
Nantenaina Soa

- Santé Publique

Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

- Sciences Fondamentales et Mixtes

Pr. AHMAD Ahmad

- Tête et cou

Pr. ANDRIAMAMONJY Clément

-Vétérinaire

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO

.....Henriette

#### IV. CONSEIL SCIENTIFIQUE

**PRESIDENT**

M. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa

#### V. COLLEGE DES ENSEIGNANTS

**A. PRESIDENT**

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA  
Nantenaina Soa

**B- ENSEIGNANTS PERMANENTS**

##### **B. 1. PROFESSEURS TITULAIRES D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE**

###### **DEPARTEMENT BIOLOGIE**

- Immunologie

Pr. RASAMINDRAKOTROKA Andry

###### **DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES**

- Dermatologie

Pr. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa

- Endocrinologie et métabolisme

Pr. RAMAHANDRIDONA Georges

- Néphrologie

Pr. RAJAONARIVELO Paul

Pr. RABENANTOANDRO Rakotomanantsoa

- Neurologie

Pr. TEHINDRAZANARIVELO Djacoba Alain

- Pneumologie-Phtisiologie

Pr. ANDRIANARISOA Ange

###### **DEPARTEMENT MERE ET ENFANT**

- Pédiatrie néonatale

Pr. RANDRIANASOLO Olivier

- Pédiatrie

Pr. RAVELOMANANA RAZAFIARIVAO Noëline

###### **DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE**

- Administration et Gestion Sanitaire

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO  
Henriette

- Education pour la Santé

Pr. ANDRIAMANALINA Nirina Razafindrakoto

- Santé Communautaire

Pr. RANDRIANARIMANANA Dieudonné

- Santé Familiale

Pr. RANJALAHY RASOLOFOMANANA Justin

- Statistiques et Epidémiologie

Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

###### **DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES**

- Anatomie Pathologique

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA  
Nantenaina Soa

- Anesthésie-Réanimation

Pr. RANDRIAMIARANA Mialimanana Joël

###### **DEPARTEMENT TETE ET COU**

- Ophtalmologie

Pr. ANDRIANTSOA RASOAVELONORO  
Violette

Pr. BERNARDIN Prisca

- Stomatologie

Pr. RAKOTOVAO Joseph Dieudonné

## **B.2. PROFESSEURS D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE**

### **DEPARTEMENT BIOLOGIE**

- |                          |                                      |
|--------------------------|--------------------------------------|
| - Biochimie              | Pr. RANAIVO HARISOA Lala             |
| - Hématologie Biologique | Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat        |
| - Parasitologie          | Pr. RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy Soa |

### **DEPARTEMENT CHIRURGIE**

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| - Chirurgie Cardio-Vasculaire | Pr. RAVALISOA Marie Lydia Agnès                                       |
| - Chirurgie Générale          | Pr. RAKOTO - RATSIMBA Hery Nirina                                     |
| - Chirurgie Pédiatrique       | Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana                                     |
| - Chirurgie Thoracique        | Pr. RAKOTOVAO Hanitrana Jean Louis                                    |
| - Chirurgie Viscérale         | Pr. SAMISON Luc Hervé<br>Pr. RAKOTOARIJAONA Armand                    |
| - Orthopédie Traumatologie    | Pr. RAZAFIMAHANDRY Henri Jean Claude<br>Pr. SOLOFOMALALA Gaëtan Duval |
| - Urologie Andrologie         | Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora                                |

### **DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES**

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| - Cardiologie                      | Pr. RABEARIVONY Nirina                                       |
| - Hépatogastro-entérologie         | Pr. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrana                            |
| - Maladies Infectieuses            | Pr. RANDRIA Mamy Jean de Dieu                                |
| - Néphrologie                      | Pr. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck                  |
| - Psychiatrie                      | Pr. RAHARIVELO Adeline<br>Pr. RAJAONARISON Bertille Hortense |
| - Radiothérapie-Oncologie Médicale | Pr. RAFARAMINO RAZAKANDRAINA Florine                         |

### **DEPARTEMENT MERE ET ENFANT**

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| - Gynécologie Obstétrique | Pr. ANDRIANAMPANALINARIVO HERY Rakotovao                          |
| - Pédiatrie               | Pr. RAOBIJAONA Solofoniaina Honoré<br>Pr. ROBINSON Annick Lalaina |

### **DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE**

- |                             |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| - Nutrition et Alimentation | Pr. ANDRIANASOLO Roger |
|-----------------------------|------------------------|

### **DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES**

- |  |  |
|--|--|
| - Radiodiagnostic et Imagerie Médicale | Pr. AHMAD Ahmad                          |
| - Physiologie                          | Pr. RAKOTOAMBININA Andriamahery Benjamin |

### **DEPARTEMENT TETE ET COU**

- |   |   |
|---|---|
| - Neuro-chirurgie                           | Pr. ANDRIAMAMONJY Clément<br>Pr. RABARIJAONA Mamiarisoa |
| - Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale | Pr. RAZAFINDRABE John Alberto Bam                       |

### **DEPARTEMENT VETERINAIRE**

- |                 |                       |
|-----------------|-----------------------|
| - Pharmacologie | Pr. RAFATRO Herintsoa |
|-----------------|-----------------------|

### **B.3. MAITRES DE CONFERENCES**

#### **DEPARTEMENT MERE ET ENFANT**

- Obstétrique

Dr. RAZAKAMANIRAKA Joseph

#### **DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE**

- Santé Publique

Dr. RANDRIAMANJAKA Jean Rémi

#### **DEPARTEMENT VETERINAIRE**

- Bactériologie, Virologie, Maladies Infectieuses  
- Sciences Ecologiques, Vétérinaires Agronomiques  
et Bioingenieries

Dr. RAJAONARISON Jean Joseph  
Dr. RAHARISON Fidiniaina Sahondra

#### **DEPARTEMENT PHARMACIE**

- Pharmacologie Générale  
- Pharmacognosie  
- Biochimie Toxicologie  
- Chimie Organique et Analytique

Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David  
Dr. RAOELISON Emmanuel Guy  
Dr. RAJEMIARIMOELISOA Clara  
Dr. RAKOTONDRAMANANA Andriamahavola  
Dina Louisino

### **B. 4. ASSISTANTS**

#### **DEPARTEMENT VETERINAIRE**

- Virologie  
- Technologie

Dr. KOKO  
Dr. RAHARIMALALA Edwige Marie Julie

#### **DEPARTEMENT PHARMACIE**

- Procédés de Production, Contrôle et Qualité  
des Produits de Santé

Dr. RAVELOJAONA RATSIMBAZAFIMAHEFA  
Hanitra Myriam

### **C. ENSEIGNANTS NON PERMANENTS**

#### **C. 1. PROFESSEURS EMERITES**

Pr. ANDRIAMBAO Damasy  
Pr. ANDRIANANDRASANA Arthur  
Pr. ANDRIANJATOVO Joseph  
Pr. AUBRY Pierre  
Pr. FIDISON Augustin  
Pr. GIZY Ratiambahoaka Daniel  
Pr. KAPISY Jules Flaubert  
Pr. RABARIOELINA Lala  
Pr. RABENANTOANDRO Casimir  
Pr. RABETALIANA Désiré  
Pr. RADESA François de Sales  
Pr. RAHARIJAONA Vincent Marie  
Pr. RAJAONA Hyacinthe  
Pr. RAKOTOMANGA Robert

Pr. RAKOTOMANGA Samuel  
Pr. RAKOTO-RATSIMAMANGA S. U  
Pr. RAKOTOZAFY Georges  
Pr. RAMAKAVELO Maurice Philippe  
Pr. RAMONJA Jean Marie  
Pr. RANDRIAMAMPANDRY  
Pr. RANDRIAMBOLOLONA Aimée  
Pr. RANDRIARIMANGA Ratsiatery Honoré Blaise  
Pr. RASOLOFONDRAIBE Aimé  
Pr. RATOVO Fortunat  
Pr. RATSIVALAKA Razafy  
Pr. RAZANAMPARANY Marcel  
Pr. ZAFY Albert

## **C.2. CHARGE D'ENSEIGNEMENT**

### **DEPARTEMENT CHIRURGIE**

- Chirurgie Générale

Pr. RAVELOSON Jean Roger

### **DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES**

- Cardiologie

Pr. RAKOTOARIMANANA Solofonirina

### **DEPARTEMENT TETE ET COU**

- ORL et Chirurgie Cervico-Faciale

Pr. RAKOTO Fanomezantsoa Andriamparany

## **VI. SERVICES ADMINISTRATIFS**

### **SECRETAIRE PRINCIPAL**

Mme. RASOARIMANALINARIVO Sahondra H.

### **CHEFS DE SERVICES**

SERVICE DES AFFAIRES FINANCIERES

M. RANDRIARIMANGA Henri

LABORATOIRE D'APPUI A LA RECHERCHE  
ET TECHNOLOGIE DE L'INFORMATION  
ET DE LA COMMUNICATION (LARTIC)

M. RAZAFINDRAKOTO Willy Robin

RESSOURCES HUMAINES

Mme. RAKOTOARIVELO Harimalala F.

SCOLARITE

Mme. SOLOFOSAONA R. Sahondranirina

TROISIEME CYCLE LONG

Mme. RANIRISOA Voahangy

## **VII. IN MEMORIAM**

Pr. RAMAHANDRIARIVELO Johnson  
Pr. RAJAONERA Frédéric  
Pr. ANDRIAMASOMANANA Veloson  
Pr. RAKOTOSON Lucette  
Pr. ANDRIANJATOVO RARISOA Jeannette  
Dr. RAMAROKOTO Razafindramboa  
Pr. RAKOTOBÉ Alfred  
Pr. ANDRIAMIANDRA Aristide  
Dr. RAKOTONANAHARY  
Pr. ANDRIANTSEHENO Raphaël  
Pr. RANDRIAMBOLOLONA Robin  
Pr. RAMANANIRINA Clarisse  
Pr. RALANTOARITSIMBA Zhouder  
Pr. RANIVOALISON Denys  
Pr. RAKOTOVAO Rivo Andriamiadana  
Pr. RAVELOJAONA Hubert  
Pr. ANDRIAMAMPIHANTONA Emmanuel  
Pr. RANDRIANONIMANDIMBY Jérôme  
Pr. RAKOTONIAINA Patrice

Pr. RAKOTO-RATSIMAMANGA Albert  
Pr. RANDRIANARISOLO Raymond  
Dr. RABEDASY Henri  
Pr. MAHAZOASY Ernest  
Pr. RATSIFANDRIHAMANANA Bernard  
Pr. RAZAFINTSALAMA Charles  
Pr. RANAIVOARISON Milson Jérôme  
Pr. RASOLONJATOVO Andriananja Pierre  
Pr. MANAMBELONA Justin  
Pr. RAZAKASOA Armand Emile  
Pr. RAMIALIHARISOA Angéline  
Pr. RAKOTOBÉ Pascal  
Pr. RANAIVOZANANY Andrianady  
Pr. RANDRIANARIVO  
Pr. RAKOTOARIMANANA Denis Roland  
Pr. ANDRIAMANANTSARA Lambosoa  
Pr. RAHAROLAHY Dhels  
Pr. ANDRIANJATOVO Jean José  
Pr. ANDRIANAIVO Paul Armand  
Dr. RAKOTOSIHANAKA Andriamiandra Fortuné Hubert

**LISTE DES ENSEIGNANTS IMPLIQUES DANS LA FORMATION DU  
DEPARTEMENT PHARMACIE  
ANNEE UNIVERSITAIRE 2010-2011**



## I.- CHEF DE PROJET (CHEF DE DEPARTEMENT)

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA Nantenaina Soa

## II.- ENSEIGNANTS

### II.1.- NATIONAUX

Pr. RASAMINDRAKOTROKA Andry

Pr. RASAMINDRAKOTROKA Andry  
Pr. RAKOTOZANDRINDRAINNY Raphaël

Pr. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa

Pr. RAMAHANDRIDONA Georges  
Pr. RASAMINDRAKOTROKA Andry

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO Henriette

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA Nantenaina Soa

Pr. RANDRIANTSOA Adolphe

Pr. RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothee

Pr. RAKOTOARIMANGA Jeannot

Pr. RATSIMIALA RAMONTA Isabelle

Pr. RAVELOMANANTSOA Solofonirina

Pr. RAVELONANDRO Pierre

Pr. JEANNODA Victor

Pr. RAKOTOZANDRINDRAINNY Raphaël  
Pr. RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy Soa

Pr. RANAIVOCHARISOA Lala

Pr. ANDRIANASOLO Roger

Pr. RAKOTO Alson Aimée Olivat

### MATIERES ENSEIGNEES

Immunologie fondamentale et clinique  
Pharmacologie des médicaments  
antiparasitaires, fongiques  
Médicaments antiparasitaires et fongiques

Microbiologie Générale

Dermatologie

Enseignement coordonné Diabète

Santé Publique

Biologie cellulaire  
Histo-Embryologie  
Génétique  
Enseignement coordonné Inflammation  
Anti-Inflammatoire

Pharmacologie Générale et Moléculaire  
Pharmacologie appliquée à la Thérapeutique

Chimie Physique (Atomistique)  
Chimie Organique

Chimie Physique (Thermodynamique  
chimique)

Botanique

Physique atomique

Chimie inorganique

Biologie et Génétique Moléculaire  
Toxicologie générale

Parasitologie et Mycologie

Biochimie

Nutrition

Hématologie Biologique  
Immunologie, Hématologie Fondamentale  
Immunologie Clinique

Pr. RAZAFIMAHANDRY Henri Jean Claude Pr. RAVALISOA Marie Lydia Agnès Pr. SAMISON Luc Hervé	Anatomie
Pr. SAMISON Luc Hervé Pr. RANDRIANARIVELOJOSIA Milijaona	Communication Scientifique
Pr. RASOLOFO Voahangy	Biologie et génétique moléculaire
Pr. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrana Pr. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Franck Willy	Séméiologie Médicale
Pr. RABEARIVONY Nirina Pr. ANDRIANTSEHENO Marcellin Pr. RANDRIA Mamy Jean de Dieu	Enseignement coordonné Douleurs Hygiène hospitalière et générale
Pr. ROBINSON Annick	Médication familiale
Pr. RAFATRO Herintsoa	Pharmacie vétérinaire
Pr. SAMISON Luc Hervé	Anglais
Dr. RANDRIAMANANTENASOA Tiana Nathalie Dr. RAKOTO Doll Dr. RAJEMIARIMOELISOA Clara	Biochimie
Dr. RANDRIAMANANTENASOA Tiana Nathalie Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David	Enseignement coordonné Diabète
Dr. RAVELOSON Nasolotsiry	Urgences et Secourisme
Dr. ANDRIANTSOA Jean Rubis	Biophysique
Dr. VOLOLONTIANA Marie Danielle	Médication familiale
Dr. RANDRIAMANANTENASOA Tiana Nathalie	Enseignement Coordonné Inflammation Anti-Inflammatoire
Dr. RAKOTOBE Etienne	Botanique
Dr. RAJEMIARIMOELISOA Clara	Organisation du Monde Vivant Culture Générale Toxicologie Générale Santé Publique
Dr. RAZAFIMAHEFA André	Physique générale
Dr. RANDRIATIANA Richard	Initiation à la Pharmacie et aux Médicaments Culture générale Législation
Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David	Enseignement coordonné Diabète
Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David Dr. RANDRIASAMIMANANA Jean René Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David	Pharmacologie appliquée à la Thérapeutique Pharmacocinétique

Dr. RAOELISON Guy	Pharmacognosie et Phytochimie Assurance Qualité des Médicaments Thérapeutiques Alternatives
Dr. RAMAMONJISOA Armand	Mathématiques
Dr. RAKOTONDRAMANANA Dina	Gestion Chimie Analytique
Dr. RAJEMIARIMOELISOA Clara	Toxicologie clinique et Bromatologie
Dr. RAVELOJAONA RATSIMBAZAFIMAHEFA Hanitra	Initiation à la Pharmacie et au Médicament Thérapeutiques Alternatives Assurance Qualité
Dr. RAVELOJAONA RATSIMBAZAFIMAHEFA Hanitra Dr. RASETARINERA Ony	Pharmacie Clinique et Appliquée
Dr. ANDRIANJARA Charles	Pharmacochimie (drug design)
Mme RAKOTOBÉ Holy	Informatique
Dr. RAKOTONIRINA Hortense	Médecine traditionnelle
Dr. RANDRIANIRINARISON Jean Claude	Communication interpersonnelle
Dr. RANIVOARIVELO Noromihaja	Pharmacie galénique

## II.2.- MISSIONNAIRES

Pr. Renée GRILLOT	Evolution du Monde Animal Parasitologie – Mycologie
Pr. Aziz BAKRI	Pharmacie galénique
Pr. Patrice TROUILLER	Initiation à la Pharmacie et aux Médicaments Culture générale Santé publique Pharmacie clinique et appliquée
Dr. Thierry IMBERT	Pharmacochimie moléculaire
Dr. Véronique MICHEL	Enseignement coordonné Inflammation Anti-inflammatoire EC Douleurs
Dr. Véronique PEZET	Toxicologie clinique et Bromatologie
Dr. Bouajila JALLOUL	Chimie analytique
Dr. Nawell KHALEF	Pharmacie galénique
Dr. Isabelle FEDERSPIELD	Pharmacie clinique et appliquée

## MATIERES ENSEIGNEES

## **DEDICACES**

**« Confie ton activité au Seigneur et tu réaliseras tes projets »**

**Proverbes 16 : 3**

*Je remercie DIEU tout puissant pour tout ce qu'il m'a donné ; sans son aide tout ceci sera vain.*

***Cette thèse est dédiée :***

**A mes Parents,**

*Pour leurs soutiens et encouragements et pour tout l'amour qu'ils m'ont témoigné.  
Que cette thèse constitue à votre égard un témoignage de ma vive reconnaissance*

**A mes frères et Sœurs,**

**A toute ma famille,**

*Pour leur patience et leur encouragement tout au long de mes études.  
Vous avez consenti à tous les sacrifices pour me voir réussir,  
Recevez en retour ces quelques mots qui ne suffisent pas pour traduire tout l'amour que  
je vous porte*

**A tous mes amis**

**A la promotion ODIANA**

**Tsiaro : RAKOTOBÉ Pascal**

**A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse**

*Mes sincères remerciements*

**A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE**

**Madame le Docteur RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothée**

Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences

Responsable pédagogique de la première année, Pharmacie

*Veillez trouver ici le témoignage de notre admiration et de notre vive reconnaissance, tant pour la bienveillance avec laquelle vous nous avez guidé et vos encouragements que pour les marques de confiance que vous nous avez témoigné.*

**A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE**

**Monsieur le Docteur JEANNODA Victor**

Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences

*Qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse malgré ses nombreuses occupations,*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.*

## **A NOS MAITRES ET HOHORABLES JUGES DE THESE**

**Monsieur le Professeur RAVELONANDRO Pierre**

Professeur d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Chimie Inorganique à la  
Faculté des Sciences d'Antananarivo

**Madame le Docteur RATSIMALA RAMONTA Isabelle**

Professeur à la Faculté des Sciences

*Vos conseils et remarques seront considérés comme un enseignement et une aide pour  
nos futures investigations,*

*Veuillez agréer nos sincères remerciements.*

## **A NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THESE**

**Monsieur le Docteur RAOELISON Emmanuel Guy**

Maître de Conférences à la Faculté de Médecine

Responsable pédagogique de la troisième année, Pharmacie

*Qui nous a proposé le sujet de cette thèse.*

*Pour les enseignements que vous nous avez prodigués, le temps précieux que vous nous  
avez consacré, l'aide permanente et les nombreux conseils que vous nous avez apportés  
tout au long de cette thèse, croyez à notre gratitude et notre profonde reconnaissance.*

**A NOTRE MAITRE ET DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE  
D'ANTANANARIVO**

**Monsieur le Professeur RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa**

*Soyez assuré de notre plus haute considération et notre profond respect*

**A NOTRE MAITRE ET CHEF DE DEPARTEMENT PHARMACIE**

**Monsieur le Professeur RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA Nantenaina  
Soa**

*Qu'il nous soit permis de vous adresser toute notre reconnaissance*

**A NOTRE MAITRE ET COORDONATEUR PEDAGOGIQUE**

**Monsieur le Professeur RANDRIANTSOA Adolphe**

*Veuillez recevoir l'expression de nos vifs remerciements et de notre profond respect*

**A NOS MAITRES ET PROFESSEURS DU DEPARTEMENT PHARMACIE**

*Qui ont contribué à notre formation pendant les années académiques,*

*Nous vous prions d'accepter notre plus haute gratitude et notre profonde  
reconnaissance.*

**A TOUT LE PERSONNEL DU SERVICE DE SCOLARITE DE LA  
PHARMACIE**

*Nos sincères remerciements pour les services que vous nous avez apportés.*

**A TOUT LE PERSONNEL ADMINISTRATIF ET TECHNIQUE DE LA  
FACULTE DE MEDECINE D'ANTANANARIVO**

*Nos vifs remerciements.*



## **REMERCIEMENTS**

*J'adresse ma profonde gratitude et ma vive reconnaissance à Madame la Présidente de l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA), Madame le Professeur RATSIMAMANGA URVERG Suzanne, qui a bien voulu nos accueillir dans son Institut*

*J'aimerais également remercier Mamy RAFAMANTANANA pour sa disponibilité et ses conseils dans la réalisation de cette thèse*

*Je ne saurais oublier ma cousine Kanto Hasina qui m'a tenu la main dans la réalisation de ce présent travail*

## SOMMAIRE

Pages

<b>I- INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II- GENERALITES.....</b>	<b>4</b>
II.1. Définitions .....	4
II.2. La chromatographie (11) (12).....	5
II.3. Validation d'une méthode d'identification par CCM (13) .....	7
➤ Stabilité .....	8
➤ Robustesse.....	9
II.4. Identification par caractérisation des stomates (14) .....	9
II.5. Présentation des plantes .....	11
II- 5.1. <i>Aphloia theiformis</i> (15-24).....	11
➤ Position systématique.....	11
➤ Description botanique .....	12
➤ Répartition géographique.....	13
➤ Utilisations traditionnelles .....	13
➤ Constituants chimiques (21, 22 , 23 ,24).....	13
II.5.2. <i>Mangifera indica</i> (2, 25-28).....	13
➤ Constituants chimiques (28) .....	15
II.6. Mangiferine ou aphloiol (26-30) .....	15
<b>III. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>19</b>
III.1. Matériels .....	19
• Matériels végétaux .....	19•
Verreries et appareillages.....	19•
Produits et réactifs chimiques .....	21

III.2. Méthodes .....	21
• Séchage du matériel végétal.....	21
• Extraction.....	21
• Préparation du produit de référence standard.....	23
• Préparation des réactifs (43) .....	24
• Préparation de l'éluant .....	24
• Chromatographie sur couche mince (CCM) (44, 45).....	24
• Évaluation .....	25
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>32</b>
IV.1. Chromatographie de mangiférine, de <i>A. theiformis</i> MBR et de <i>M. indica</i> .....	32
IV.2. Stabilité .....	34
IV.2.1. Stabilité de l'analyte dans la solution et sur la plaque .....	35
IV.2.2. Stabilité de l'analyte durant la chromatographie .....	36
IV.2.3. Stabilité du chromatogramme après dérivatisation par l'anisaldéhyde sulfurique .	36
IV.3. Spécificité.....	39
IV.3.2. Détection d'adultérant .....	40
IV.4. Fidélité.....	41
IV.4.1. Répétabilité.....	42
IV.4.2. Précision intermédiaire .....	45
IV.5.1. Évaluation de la robustesse selon le type de la cuve.....	47
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>54</b>
<b>VI. CONCLUSION .....</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	

## LISTE DES TABLEAUX

	Pages
<b>Tableau I:</b> verreries et appareillages de laboratoire .....	20
<b>Tableau II:</b> liste des produits et réactifs utilisés .....	21
<b>Tableau III :</b> résultats de CCM de Mangiferine, des solutions, d'extraits de feuilles de <i>A. theiformis</i> MBR et de: <i>M. indica</i> .....	34
<b>Tableau IV:</b> valeurs moyennes inter-séries de Rf de Mangiferine et la différence des Rf notée $\Delta Rf$ .....	44
<b>Tableau V:</b> valeurs inter-jour de Rf de Mangiferine et la différence des Rf notée $\Delta Rf$ .....	46
<b>Tableau VI :</b> valeurs de Rf de Mangiferine obtenues selon le type de cuve utilisée et la différence des Rf notée $\Delta Rf$ .....	48
<b>Tableau VII:</b> valeurs de Rf de Mangiferine selon la distance parcourue par le front du solvant et la différence des Rf notée $\Delta Rf$ .....	50
<b>Tableau VIII :</b> valeurs de Rf de Mangiferine en fonction de la température de migration.	52

## LISTE DES FIGURES

	Pages
<b>Figure 1:</b> Représentation de la migration d'une CCM.....	7
<b>Figure 2 :</b> Différents types de stomates.....	10
<b>Figure 3:</b> Formule chimique de la Mangiferine .....	16
<b>Figure 4 :</b> Procédé d'extraction de poudre de feuilles des échantillons.....	23
<b>Figure 5 :</b> Disposition des dépôts sur la plaque pour l'étude de la stabilité.....	27
<b>Figure 6:</b> Chromatogrammes de Mangiferine, <i>A. theiformis</i> MBR et <i>M. indica</i> : .....	32
<b>Figure 7 :</b> chromatogrammes CCM obtenus lors d'étude de la stabilité de l'analyte en solution et sur la plaque .....	35
<b>Figure 8 :</b> chromatogrammes CCM à 2 dimensions obtenus lors de l'étude de la stabilité de l'analyte durant la chromatographie .....	36
<b>Figure 9 :</b> chromatogrammes CCM obtenus <i>A. theiformis</i> MBR et <i>M. indica</i> lors de l'étude de la stabilité après dérivatisation par anisaldéhyde sulfurique .....	37
<b>Figure 10 :</b> chromatogrammes de <i>A. theiformis</i> MBR et de <i>A. theiformis</i> .....	38
<b>Figure 11 :</b> chromatogrammes de <i>A. theiformis</i> , de quatre variétés de <i>M. indica</i> ,.....	39
<b>Figure 12:</b> chromatogramme obtenu après dérivatisation par anisaldéhyde sulfurique lors de l'identification de <i>A. theiformis</i> .....	40
<b>Figure 13 :</b> chromatogramme CCM obtenu après dérivatisation par anisaldéhyde sulfurique lors de l'identification de <i>A. theiformis</i> .....	41
<b>Figure 14 :</b> chromatogrammes obtenus lors de l'étude de la répétabilité dans un court intervalle de temps .....	43
<b>Figure 15:</b> chromatogrammes CCM obtenus lors de l'étude la fidélité intermédiaire :.....	45
<b>Figure 16 :</b> chromatogrammes CCM obtenus lors de l'étude de la robustesse selon le type de cuve utilisée.....	47
<b>Figure 17 :</b> chromatogrammes CCM obtenus lors de l'étude de la robustesse en modifiant la distance parcourue par le front du solvant :	
<b>Figure 18 :</b> chromatogrammes obtenus en faisant varier les températures de migration : (a) 23°C.....	51

**Figure 19** : poudre de feuilles montrant les stomates vue au microscope  
(grossissement X 400) :(a) *A. theiformis* MBR ; (b) *M. indica* ..... 53

## LISTE DES PHOTOS

Photos 1 : <i>Aphloia theiformis</i> .....	12
Photos 2 : .....	14

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

$\leq$ : inférieur ou égal

$^{\circ}\text{C}$  : degré Celsius

$\mu\text{l}$  : microlitre

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

cm : Centimètre

g : gramme

mg : milligramme

mL : millilitre

mn : minute

R<sub>f</sub> : Référence frontale

t : temps

UV : Ultraviolet

$\Delta$  : écart

$\lambda$  : longueur d'onde



## I- INTRODUCTION

Madagascar est un des pays naturellement riches en plantes médicinales. Cette richesse florale abrite environ 200 familles avec un taux d'endémicité spécifique élevé avoisinant les 80% (1). Cette flore caractéristique procure aux malgaches leurs matériaux de construction, leurs sources d'alimentation et de remèdes constituant ainsi la pharmacie de la nature facilement accessible pour beaucoup d'entre eux. La médecine traditionnelle tient une grande place pour la majorité de la population malgache en termes de soin de santé primaire(2). Son coût est relativement faible et son efficacité n'est plus à démontrer. De plus, le coût relativement élevé des médicaments de synthèse fait de cette médecine traditionnelle le soin de santé de premier recours. Depuis une décennie, on constate un regain d'intérêt pour cette forme de thérapie. Les plantes médicinales sont la source potentielle de molécules biologiquement actives utilisables en thérapeutique; et on estime que 25 % des médicaments mis sur le marché sont d'origine naturelle (3) (4). L'OMS encourage tous les pays à allier cette utilisation traditionnelle des plantes médicinales à la médecine moderne. Le code de la santé malgache datant de 1962 et toujours en vigueur ne prévoit pas l'utilisation des plantes dans le système de santé national. Mais la situation actuelle tend vers la reconnaissance de cette thérapie. Actuellement, le Ministère de la Santé Publique malgache recommande lui-même d'allier l'utilisation de la pharmacopée traditionnelle aux médicaments occidentaux. Trois commissions ont été mises en place afin d'assurer cette complémentarité: la commission législation, la commission phytomédicament et la commission pharmacopée (5,6). C'est ainsi que la première version de la Pharmacopée Malagasy sous le nom de «Vers une Pharmacopée Malagasy» a vu le jour. Ce premier volume comporte une vingtaine de monographies de plantes médicinales de Madagascar parmi lesquelles figure celle de *Aphloia theiformis*, une plante très consommée par les ménages malgaches qui l'utilisent sous forme de tisane appelée communément « dite ». Cette plante entre dans la formulation de nombreuses préparations à base de plantes commercialisées comme le Fanazava®, produit fabriqué par l'IMRA. Son identification, surtout quand elle se présente sous forme de poudre, ne figure pas dans le premier volume de la Pharmacopée Malagasy. C'est pour cette raison que nous avons choisi *Aphloia theiformis* comme objet de ce travail intitulé «Contribution à

l'établissement de la monographie de *Aphloia theiformis* : développement et validation de méthode d'identification». De par sa complexité, l'utilisation de plantes comme moyens thérapeutique incite à la prudence et à la bonne connaissance de la plante. Beaucoup de littératures scientifiques rapportent des accidents toxicologiques faisant suite à l'utilisation de la plante. Ces accidents sont dus à la mauvaise utilisation de la plante, à des problèmes de surdosage, à la mauvaise identification de la plante (7).

L'identification de la plante est un des critères à considérer et à mettre en œuvre pour assurer la qualité de la plante médicinale et de ses produits dérivés.

Pour le cas de *Aphloia theiformis*, objet de cette étude, la caractérisation de son principe actif, la mangiferine (ou aphloiol), dans les feuilles ne suffit pas à garantir l'identification. En effet, la mangiferine est présente dans d'autres plantes telles que *Mangifera indica*, certaines espèces de caféier (8). Par conséquent, deux plantes contenant le même principe actif, la mangiferine, ont été examinées dans cette étude : *Aphloia theiformis* (Flacourtiaceae) et *Mangifera indica* (Anacardiaceae). Si les deux plantes sont faciles à identifier par leurs caractères phénotypiques, sous forme de poudre et faute d'outils de vérification, il serait difficile de les distinguer, surtout si on ne considère que la présence de la mangiferine.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'assurance qualité des plantes médicinales et de leurs produits dérivés en tant que produits de santé. Pour le cas des deux plantes étudiées, des préparations médicamenteuses existent sur le marché : Fanazava® à base de *A. theiformis*, Vimang® à base de *M. indica*. Cette étude est donc destinée à prévenir une éventuelle falsification quand le produit se présente sous forme de poudre et c'est pour cette raison que la poudre des feuilles de *Mangifera indica* est étudiée en parallèle avec celle de *Aphloia theiformis*. La garantie de la qualité des phytomédicaments commence par le soin de la qualité des matières premières. Par ailleurs, une étude de toxicité utilisant le test hémolytique a été faite vu que la plante contient de saponines.

Ce travail a pour but de développer et de valider une méthode d'analyse qualitative d'identification de *A. theiformis* en tant que matière première. Les résultats obtenus pourront étoffer la monographie de la plante et serviront au contrôle de routine des matières premières et de leurs produits dérivés.

La première partie de ce travail expose les généralités sur la médecine traditionnelle, les plantes et la méthode d'identification. Cette partie est suivie de la

présentation des matériels et méthodes utilisés. Viennent ensuite les résultats et les discussions. La conclusion et les perspectives termineront le manuscrit. Les références bibliographiques et webographiques sont mentionnées à la fin de l'ouvrage.

## II- GENERALITES

### II.1. Définitions

#### ➤ Médecine traditionnelle et tradithérapeutes (6,9)

Selon l'OMS, la médecine traditionnelle « se rapporte aux pratique, méthode, savoir, et croyance en matière de santé qui implique l'usage à des fins médicales des plantes, des parties d'animaux et des minéraux, des thérapies spirituelles, des techniques et des exercices manuels séparément ou en association pour soigner ou diagnostiquer ou prévenir des maladies ou préserver la santé ».

Dans les pays industrialisés, elle se définit ainsi comme médecine « complémentaire » ou « alternative » ou « non conventionnelle » ou encore « parallèle ».

Un tradithérapeute ou tradipraticien est celui qui exerce une pratique médicinale non conventionnelle, reposant sur des approches présentées comme traditionnelles

#### ➤ Pharmacopée (5)

Elle définit notamment les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments à usage humaine ou vétérinaire, et les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer leur contrôle.

L'ensemble des critères d'informations nécessaires permettant d'assurer une qualité est regroupé et publié sous forme de monographie.

#### ➤ Pharmacopée traditionnelle (5)

C'est le recensement des connaissances ethnomédicales sur les plantes à partir des enquêtes auprès des populations ou des tradipraticiens. Elle peut concerner une région, telle la Pharmacopée de l'Alaotra, une ethnie, comme la Pharmacopée des Masikoro.

#### ➤ Monographie d'usage (5)

La monographie d'usage se définit comme étant la synthèse bibliographique des données ethnomédicales, botaniques, chimiques, pharmacologiques, cliniques publiées d'une plante donnée d'une pharmacopée traditionnelle.

### ➤ **Plantes médicinales (10)**

Elle se définit comme une plante ou partie de la plante, utilisée en l'état, soit le plus souvent sous forme desséchée soit à l'état frais.

## **II.2. La chromatographie (11) (12)**

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Les constituants de l'échantillon à analyser sont entraînés à travers la phase stationnaire par le flux d'une phase mobile gazeuse ou liquide, et les séparations résultent de la différence entre les vitesses de propagation des diverses substances. En chromatographie :

- la phase stationnaire est une phase qui reste en place soit dans une colonne soit sur une surface plane. Elle peut être solide (silice, alumine...) ou liquide.
- La phase mobile est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire en entraînant l'analyte avec elle.

On peut classer les méthodes chromatographiques selon :

- La nature des deux phases
  - Phase mobile: gaz ou liquide
  - Phase stationnaire : solide pulvérisé ou liquide immobilisé sur un support solide
- Le procédé d'immobilisation de la phase chromatographique
  - Sur colonne
  - Sur papier
  - Sur couche mince
- Les modalités de migration de la phase mobile
  - Par développement
  - Par élution
- La polarité relative des deux phases
  - Chromatographie en phase mobile
  - Chromatographie en phase inversée
- Le phénomène chromatographique
  - Chromatographie d'adsorption

- Chromatographie de partage
- Chromatographie par échange d'ions
- Chromatographie d'exclusion

### ➤ **Chromatographie sur Couche Mince (CCM)**

Le terme chromatographie vient du mot grec *Khroma*, *atos* signifiant « couleur ». Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La C.C.M. est un procédé de microanalyse utilisant une phase stationnaire poreuse le long de laquelle une phase mobile entraîne à vitesse inégale suivant une direction déterminée, les substances à séparer. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse par capillarité le long d'une phase stationnaire déposée en un film très adhérent sur une plaque de verre ou sur une feuille d'aluminium ou de plastique semi-rigide. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à leur propre vitesse, derrière le front du solvant.

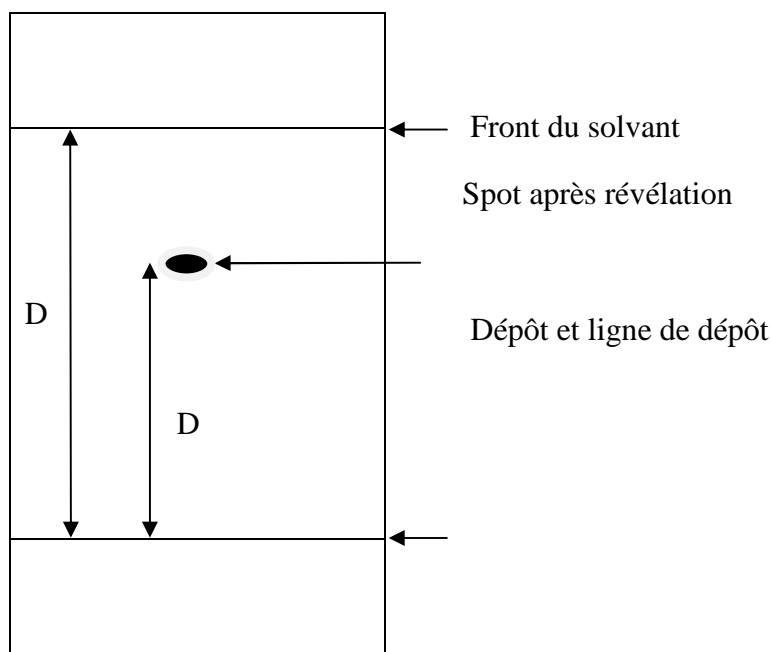
La vitesse de migration est fonction de l'affinité des constituants vis à vis de la phase liquide mobile et/ou de la phase fixe adhérent au support chromatographique. La CCM s'effectue de manière descendante, radiale ou ascendante. Cette dernière est la plus utilisée.

Selon leurs affinités pour les deux phases, chaque substance occupe de façon distinguée une position appelée référence frontale qui est le rapport entre les distances parcourues, depuis les points d'applications, par la substance et le solvant.

$$R_f = \frac{d}{D}$$

*d*: distance parcourue par la substance

*D*: distance parcourue par le front du solvant



**Figure 1:** représentation de la migration d'une CCM

### **II.3.Validation d'une méthode d'identification par CCM (13)**

Valider c'est apporter des preuves que la méthode est adaptée à ses objectifs. La validation d'une méthode d'identification fait partie de l'assurance qualité d'un produit que ce soit un produit fini ou un extrait brut. Elle est utilisée dans plusieurs domaines : pharmaceutique, environnemental, agro-alimentaire, médical, industriel et dans le cadre de la toxicologie.

Le but de la validation d'une méthode d'identification est de démontrer qu'une procédure d'analyse correspond à l'usage pour lequel elle est prévue.

La validation d'une méthode commence par la préparation de l'échantillon et se termine par les résultats. Le développement de méthode et sa validation sont inséparables car une méthode mise au point ne peut être utilisée comme méthode de référence dans les procédures de contrôle de qualité.

Lors de la validation d'une méthode d'identification, les critères suivants sont à étudier (9) :

- Stabilité
- Spécificité /sélectivité
- Fidélité
- Robustesse

➤ **Stabilité**

La stabilité du composé à analyser doit être préalablement démontrée pour les conditions expérimentales étudiées. C'est une étude préliminaire qui démontre la capacité des analytes de l'échantillon à analyser de garder leurs propriétés caractéristiques.

➤ **Spécificité**

La spécificité d'une méthode d'analyse est sa capacité à permettre l'évaluation sans équivoque de l'analyte parmi les autres constituants de l'échantillon.

Elle permet d'établir que le signal mesuré dans les conditions opératoires étudiées provient uniquement de l'analyte.

➤ **Fidélité**

C'est l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai provenant d'un même échantillon homogène, dans des conditions prescrites.

Elle peut être considérée à 3 niveaux:

- *Répétabilité*

La répétabilité est la fidélité obtenue dans des conditions identiques (même analyste, même équipement, mêmes réactifs...) et se passe dans un court intervalle de temps.

- *Fidélité intermédiaire*

Elle exprime la fidélité sous des conditions variables à l'intérieur d'un même laboratoire (analystes différents, mêmes équipements, mêmes réactifs, conditions expérimentales identiques).



- *Reproductibilité*

Elle exprime la fidélité sous des conditions variables (analystes différents, équipements différents, mêmes échantillons, conditions expérimentales identiques). Elle est réalisée avec des essais inter-laboratoires.

➤ **Robustesse**

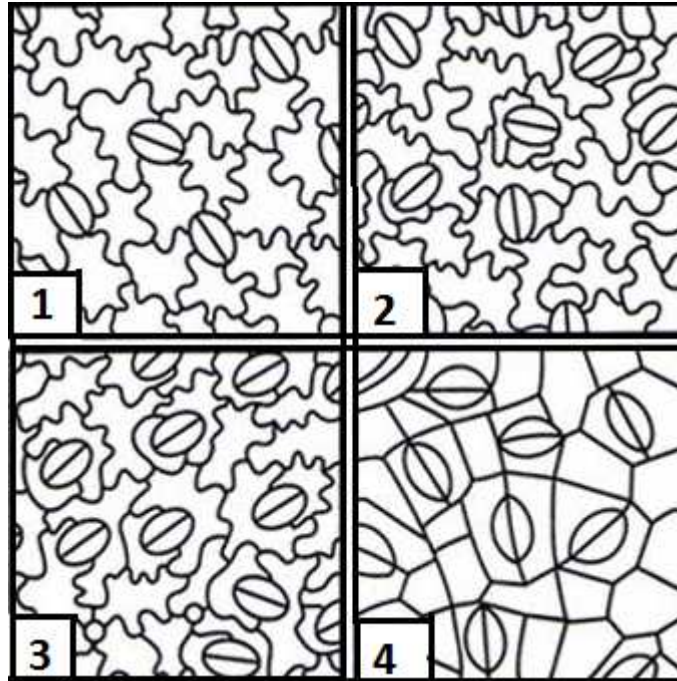
La robustesse d'une méthode se définit par la capacité de la méthode à ne pas être affectée par de faibles variations de ses paramètres comme cela peut se produire dans un laboratoire durant l'utilisation prolongée en contrôle de routine (température, humidité relative, cuve utilisée, distance parcourue par le solvant,...)

#### **II.4. Identification par caractérisation des stomates (14)**

Un stomate est constitué par deux cellules réniformes : les cellules stomatiques et les cellules annexes dont la disposition est caractéristique d'une espèce. Son rôle est d'assurer les échanges gazeux entre la plante et son milieu extérieur. Selon la pharmacopée européenne, cette caractéristique est un outil complémentaire aux autres techniques d'identification (chimique) d'une plante.

Selon la Pharmacopée Européenne, on distingue 4 types de stomates :

- 1- Type anomocytique (cellules irrégulières) : les stomates se trouvent entourés d'un nombre variable de cellules qui ne diffèrent en aucune façon des cellules de l'épiderme en général.
- 2- Type anisocytique (cellules inégales) : les stomates sont normalement entourés par 3 cellules annexes dont l'une est nettement plus petite que les autres.
- 3- Type diacytique (cellules transversales) : les stomates sont accompagnés par 2 cellules annexes dont les parois communes font un angle droit avec les cellules de garde des stomates.
- 4- Type paracytique (cellules parallèles) : les stomates possèdent de chaque côté une ou plusieurs cellules annexes parallèles à l'axe longitudinal de l'ostiole et des cellules de garde des stomates.



**Figure 2** : différents types de stomates

(Source : Pharmacopée Européenne, 4<sup>ème</sup> édition, 2002)

**1** : type anomocytique

**2** : type anisocytique

**3** : type diacytique

**4** : type paracytique

## II.5.Présentation des plantes

Dans le cadre de cette étude, deux plantes différentes ont été utilisées et comparées pour pouvoir dégager les caractères chimiques et botaniques permettant de développer la méthode d'identification : *A. theiformis* (Flacourtiaceae) et *M. indica* (Anacardiaceae)

### II-5.1. *Aphloia theiformis* (15-24)

*A. theiformis* est communément appelée Dite, Ravimboafotsy, Tsilomay, Voafotsy, Fandramana, kirandrambehivavy, Maramanana, Miaramanana, Hazondrano, goyave marron, change écorce.

#### ➤ Position systématique

*A. theiformis* appartient à :

<b>Règne</b>	Végétal
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous classe</b>	Rosidae
<b>Ordre</b>	Crossosomatales
<b>Famille</b>	Flacourtiaceae
<b>Genre</b>	<i>Aphloia</i>
<b>Espèce</b>	<i>theiformis</i>



**Photo 1 :** *Aphloia theiformis*

(Source : M. Gilson)

*A. theiformis* possède 7 synonymes :

- *Aphloia madagascariensis* Clos
- *Aphloia mauritiana* Baker
- *Lightfootia theiformis* Vahl
- *Ludia heterophylla* Lam
- *Neumania myrtiflora* Th.Dur
- *Neumania theiformis* (Vahl) A. Rich
- *Prockia theiformis* (Vahl) Willd.

#### ➤ **Description botanique**

*A. theiformis* est généralement un arbuste de taille moyenne de 3 à 4 m de haut pouvant atteindre 15 m, à tronc noirâtre. Les feuilles sont simples, alternes, ovales, lancéolées, glabres et odorantes. Les rameaux rougeâtres supportent des fleurs peu nombreuses, pédonculées, ayant 5 sépales souvent inégaux, et sans pétales. Les stipules sont triangulaires latérales, petites, très caduques. Le fruit est une baie blanchâtre, un peu amère, comestible, contenant 5 à 8 graines oléagineuses de couleur beige et assez épaisses par fruit. La floraison et la fructification ont lieu d'octobre à mai.

### ➤ Répartition géographique

*A. theiformis* se trouve fréquemment sur la côte Est de Madagascar, aux Comores, dans les Mascareignes, aux Seychelles et en Afrique orientale. Cette plante est largement répandue dans toutes les forêts denses humides de la grande Ile, surtout dans les régions chaudes, et dans les sous-bois des forêts ombrophiles. Elle peut aussi se trouver sur les collines, sur les talus, dans les forêts de 0 à 2000 m d'altitude.

### ➤ Utilisations traditionnelles

L'infusion théiforme de feuilles séchées est utilisée comme cholagogue, dépurative, antihématurique et diurétique. Cette dernière propriété est liée à la présence de mangiferine dans les feuilles. A Madagascar, la décoction des feuilles est traditionnellement utilisée pour combattre plusieurs maladies : fièvres paludéennes, blénnorrhagie, ascite, calcul rénal, rhumatisme articulaire, douleur musculaire et pathologie hépatique. Les feuilles cuites sont aussi utilisées en cataplasme en cas de fracture ou de luxations. En association avec d'autres plantes comme les feuilles de *Carica papaya* (Caricaceae), elle est utilisée en cas de fièvre, de contusion et de rougeole. Dans ce dernier cas, un peu de poivre est ajouté à la décoction des feuilles de *A.theiformis*.

L'écorce et les rameaux de *A. theiformis* sont vomitifs et peuvent favoriser la diarrhée.

### ➤ Constituants chimiques (21, 22 , 23 ,24)

Les travaux phytochimiques effectués sur la plante ont mis en évidence la présence de tritèrpenes, de l'acide tormentique, de saponines, des protocyanidols, de flavonoïdes et de xanthones dont la mangiferine.

## II.5.2. *Mangifera indica* (2, 25-28)

*M. indica* est une plante très connue par les Malgaches et est communément appelée vômanga, Manga, Manguier, ou Mango.

➤ **Position systématique**

*M. indica* appartient à :

<b>Règne</b>	Végétal
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous classe</b>	Rosidae
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famille</b>	Anacardiaceae
<b>Genre</b>	<i>Mangifera</i>
<b>Espèce</b>	<i>indica</i>

Dans cette étude, la variété de *M. indica* utilisée est la « manga S ».



**Photo 2:** *Mangifera indica*

(Source: George K. Linney)

### ➤ Description botanique

*Mangifera indica* est un arbre de 15 m de haut. Elle a été introduite en Afrique par les portugais où on la surnomme « arbre de sage ». Les feuilles sont allongées à odeur aromatique, et luisantes. Les fruits, appelés mangue, sont de formes variables, généralement globuleuses et réniformes ; le noyau est unique et volumineux et s'adhère fortement à la chair.

### ➤ Utilisations traditionnelles (25 ,27)

La mangue est considérée comme l'un des fruits les plus nutritifs dont la chair est riche en provitamine A, en phosphore, en potassium et en vitamine C ; par contre, elle est pauvre en lipide et en calories et c'est pour cette raison qu'elle est très utilisée en cure d'amaigrissement et en cas d'affections cardio-vasculaires (richesse en potassium). Une décoction de 15 feuilles de manguier dans 1 litre d'eau, à boire dans la journée, est indiquée en cas de diarrhée, de toux et de bronchite selon Ramanamahefa M., reflexologue résidant à Ampitatafika. L'effet de cette préparation est moindre par rapport aux autres préparations contenant *Psidium guajava* (Myrtaceae) en cas de diarrhée par exemple.

Au Congo, la décoction de l'écorce de tiges est préconisée en cas d'aphte, de gingivite, de diarrhée et de dysenterie.

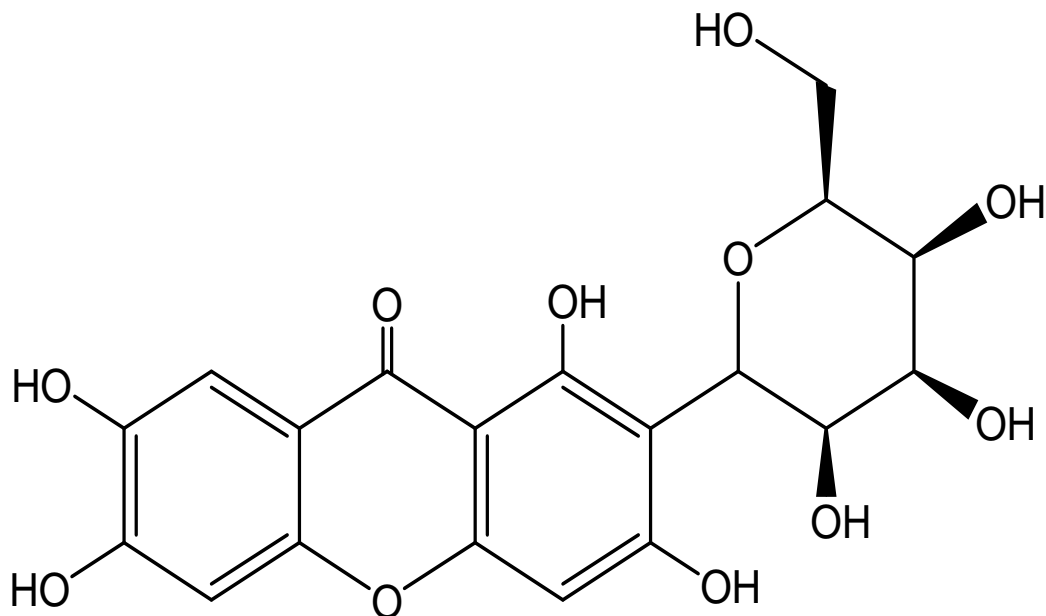
### ➤ Constituants chimiques (28)

Les travaux phytochimiques effectués sur la plante ont mis en évidence la présence d'une huile essentielle riche en thuyène et ocimène, de flavonoïdes (quercétol, kaempférol), des anthocyanes, de salicylate de méthyle et de tanins.

## II.6. Mangiferine ou aphloiol (26-30)

### ➤ Structure

La mangiferine identifiée comme 2-C-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone [ C<sub>19</sub> H<sub>18</sub>O<sub>11</sub> ] a été isolée à partir des feuilles de *M. indica*, d'où le nom de mangiferine. Ce composé a été également identifié et isolé des feuilles de *A. theiformis*.



**Figure 3:** formule chimique de la mangiferine  
(2-C-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone)

#### ➤ Activités biologiques connues

Plusieurs activités biologiques sont attribuées à la mangiferine dont :

##### - **Activité anti-allergique** (31)

Sur un modèle de souris rendues allergiques, la mangiferine a significativement (i) réduit le taux d'immunoglobuline E (IgE), (ii) inhibé les réactions anaphylactiques, (iii) réduit la réaction cutanée induite par l'histamine, et (iv) inhibé la prolifération des lymphocytes.

##### - **Propriété anti-oxydante** (32, 33, 34)

Une étude comparative de l'activité antioxydante entre mangiferine, Vimang® (préparé à partir de l'écorce de tiges de *M. indica*), vitamine C, vitamine E et  $\beta$ -carotène, en administration orale a été faite. Selon cette étude, la mangiferine et le Vimang® ont un effet plus marqué que celui des antioxydants alimentaires, et cet effet est dose dépendant.



- **Activité anti tumorale** (35, 36, 37)

Yoshimi et al (2001) ont examiné sur des rats rendus cancéreux les effets chimio-préventifs de l'aphloiol. Le groupe traité avec l'aphloiol, pendant la phase d'initiation avait présenté significativement une incidence et une multiplicité de tumeurs intestinales plus basse (> 40% réduction) avec réduction de la prolifération des cellules coliques (65-85% de baisse) par rapport au groupe non traité.

- **Activité antivirale** (37, 38, 39)

L'effet antiviral de la mangiferine *in vitro* sur les HSV-2 (*Herpes Simplex Virus* du type 2) et HSV-1 (*Herpes Simplex Virus* du type 1) a été étudié. La mangiferine inhibe la réplication de ces 2 virus HSV-1

- **Activités antibactériennes et antifongiques** (32)

Sur des tests *in vitro*, la mangiferine a montré une activité à l'encontre de sept espèces de bactéries (*Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *S. citreus*, *Escherichia coli*, *Salmonella agona*, *Klebsiella pneumoniae*), une levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et quatre champignons (*Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*).

- **Activité antiparasitaire** (40)

Sur un modèle des souris néonatales, la mangiferine à la dose de 100mg/kg a une activité inhibitrice similaire à celle de paromomycine à la même dose sur *Cryptosporidium parvum*.

- **Activité antidiabétique**

**Diabète type 1** (41)

L'injection intraveineuse de mangiferine, chez un modèle de souris diabétiques induite par streptozotocine (STZ détruit les cellules  $\beta$  du pancréas, cause de la persistance de l'hyperglycémie; 55 mg / kg de poids corporel), améliore les altérations de l'activité des enzymes anti oxydantes cardiaques et rénales, a diminué le taux d'hémoglobine et de Créatine Phosphokinase (CPK) glucosée. Le traitement avec mangiferine abouti à

une puissante activité antihyperlipidémie et une activité anti-athérogène chez les rats diabétiques.

***Diabète type 2 (42)***

La thérapie repose principalement sur l'exercice physique et l'alimentation; en deuxième ligne, des agents thérapeutiques pour stimuler la sécrétion d'insuline sont utilisés. Sur un modèle des souris diabétique de type 2. L'administration de mangiferine (30 mg / kg, per os, une fois par jour suivi de 30 min d'exercice) a réduit le taux de cholestérol sanguin (~ 40%) et de triglycérides. Mangiferine ou exercice seuls n'a pas d'influence sur le cholestérol, mais une diminution significative de la triglycéridémie.

### III. MATERIELS ET METHODES

#### III.1. Matériels

Les matériels utilisés se subdivisent en matériels végétaux et des verreries et appareillages de laboratoire

- **Matériels végétaux**

Les matériels végétaux utilisés dans cette étude sont constitués principalement de deux plantes : *A. theiformis* et *M. indica*.

Les feuilles de *A. theiformis* ont été récoltées dans le jardin botanique de l'IMRA situé à Avarabohitra Itaosy Antananarivo. La plante est identifiée formellement comme *A. theiformis* par le botaniste Mr RAKOTONIRINA Benja. Cet échantillon de feuilles est utilisé comme matériel de référence. Nous l'avons appelé matériel botanique de référence (MBR).

Les feuilles de *M. indica* ont été récoltées à Ambohimandroso I dans la région d'Ambatondrazaka. Son identification a été faite par le même botaniste.

Un autre échantillon de feuilles de *A. theiformis* a été collecté à Andranomalaza dans la région d'Amoron'i Mania. La plante n'est pas identifiée par un botaniste. Elle est utilisée comme l'échantillon « à analyser » dans l'étude.

Les trois échantillons de feuilles ont été récoltés au mois de décembre 2010.

- **Verreries et appareillages**

La liste des verreries et appareillages est portée sur le tableau I :

**Tableau I:** liste des verreries et appareillages de laboratoire

Verreries (classe A) et petits matériels	Appareils de laboratoire
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tubes à essais</li> <li>▪ Burettes graduées</li> <li>▪ Béchers</li> <li>▪ Pipettes Pasteur</li> <li>▪ Erlen meyer</li> <li>▪ Flacons</li> <li>▪ Ballons</li> <li>▪ Entonnoirs</li> <li>▪ Fioles jaugées</li> <li>▪ Spatules</li> <li>▪ Cuve chromatographique à 2 chambres en verre CAMAG</li> <li>▪ Cuve chromatographique à fond plat en verre CAMAG</li> <li>▪ Plaques CCM, analytique : gel de silice 60F<sub>254</sub> support plastique 20x20 cm, MERCK</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Balance de précision METTLER® PE163</li> <li>▪ Broyeur électrique SUZUKA</li> <li>▪ Bain ultrason type 75TC</li> <li>▪ Centrifugeur HETTICK ROTANTA®</li> <li>▪ Agitateur magnétique EDMUND BUHLER</li> <li>▪ Évaporateur rotatif ROTAVAPOR EL 130</li> <li>▪ Chauffe ballon</li> <li>▪ Séchoir</li> <li>▪ Étuve PROLABO</li> <li>▪ CAMAG TLC Spray</li> <li>▪ Pompe à vide</li> <li>▪ Lampe UV 254 /365nmCAMAG</li> <li>▪ Microscope LABORLUX S. Leitz</li> </ul>

- **Produits et réactifs chimiques**

Les produits et réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont rapportés dans le tableau II.

**Tableau II:** liste des produits et réactifs utilisés

<b>Solvants</b>		
<b>pour analyse</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Témoin</b>
Méthanol	Anisaldéhyde	Mangiferine SIGMA lot n° 014K1056
Acétate d'éthyle	sulfurique ACROS	
Acide formique	ORGANC	
Acide acétique	hydrate chloral	
Eau distillée	ACROS ORGAMC	

### III.2. Méthodes

Les méthodes utilisées et validées dans cette étude comprennent :

- La préparation de l'extrait végétal,
- La préparation des réactifs et de produit de référence,
- La CCM et l'évaluation des résultats,
- La méthode microscopique pour la détermination du type de stomates.

Un test hémolytique a été utilisé pour détecter une éventuelle toxicité de la plante et de ses produits dérivés.

#### III.2.1. Préparation de l'extrait végétal

- **Séchage du matériel végétal**

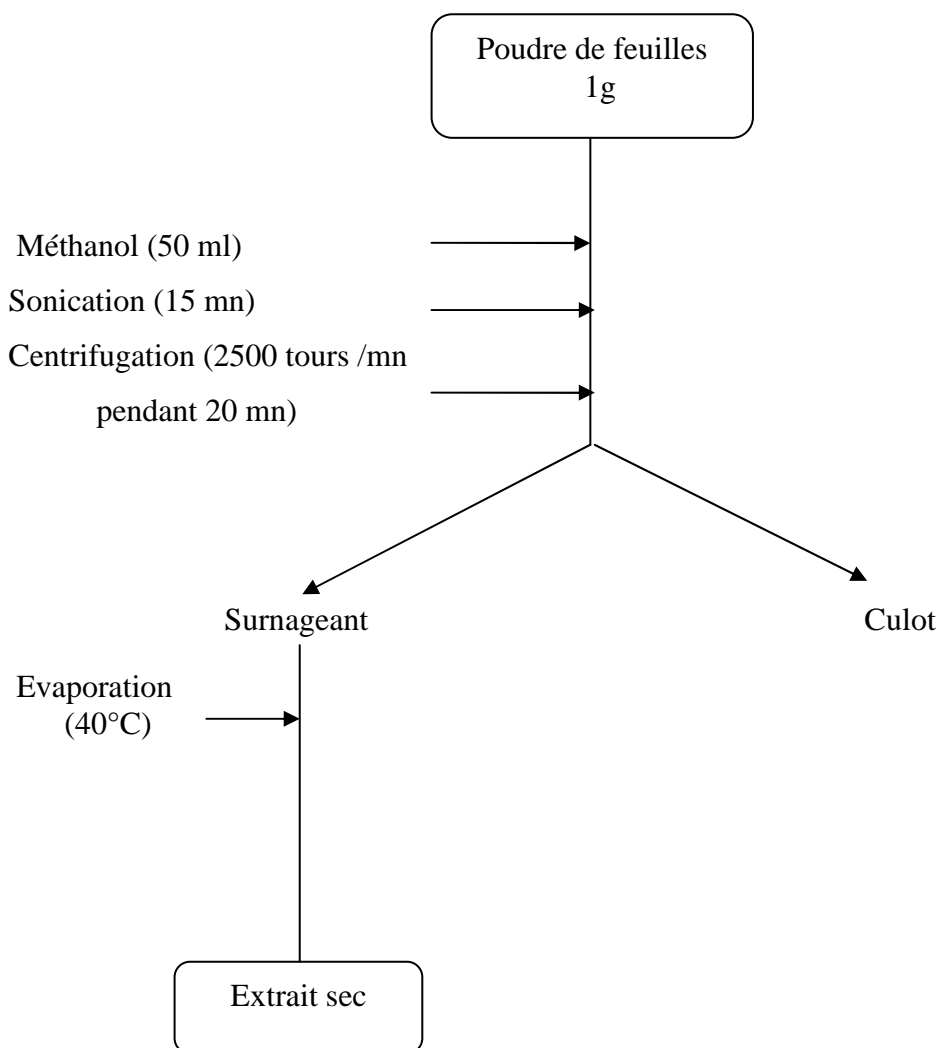
Les feuilles de *A. theiformis* et *M. indica* sont séchées à l'étuve à 40°C pendant 24 h. Elles sont ensuite réduites en poudre par broyage électrique, étiquetées puis stockées.

- **Extraction**

1g de poudre d'un échantillon est introduit dans un ballon contenant 50ml de méthanol (MeOH) puis placé dans une cuve à ultra-son. Après 15 mn de sonication, le

mélange obtenu de couleur verte est soumise à une centrifugation durant 20 mn à la vitesse de 2500 tours /mn. Le surnageant est récupéré puis le solvant est évaporé sous pression réduite à la température de 40°C. L'extrait obtenu est repris dans 10 ml de méthanol (MeOH).

Le procédé d'extraction est résumé sur la figure 4.



**Figure 4** : procédé d'extraction de poudre de feuilles des échantillons

### III.2.2. Préparation de produit de référence et des réactifs

- **Préparation du produit de référence standard**

La solution de mangiferine pure a été préparée en dissolvant 0,5 mg de mangiferine dans 1ml de méthanol (MeOH). Après agitation, on laisse la solution se reposer pendant quelques minutes. La même manipulation est répétée jusqu'à dissolution totale de mangiferine.

- **Préparation des réactifs (43)**

Les réactifs utilisés sont de deux types : le révélateur chimique pour la détection des composés sur la plaque CCM qui est l'anisaldéhyde sulfurique et, l'hydrate chloral utilisé pour l'observation au microscope.

- Anisaldéhyde sulfurique : 10 ml d'acide sulfurique sont ajoutés avec précaution, à basse température, dans 170 ml de méthanol. Puis, on ajoute dans le mélange 20 ml d'acide acétique et 1ml d'anisaldéhyde.

- Hydrate chloral : 20 ml d'eau désionisée sont versés dans 80 mg d'hydrate chloral. Le mélange est agité jusqu'à dissolution totale du soluté.

- **Préparation de l'éluant**

L'éluant est le mélange de solvants utilisés pour le développement de la plaque CCM. La préparation de l'éluant est faite dans l'ordre: 11ml d'acide formique sont ajoutés à 100 ml d'acétate d'éthyle. Après agitation, 11ml d'acide acétique puis 27ml d'eau distillée sont ajoutés successivement à la solution obtenue.

### III.2.3. CCM et évaluation des résultats

- **Chromatographie sur couche mince (CCM) (44, 45)**

Dans toutes les chromatographies que nous avons effectuées, l'adsorbant utilisé est le silicagel et l'éluant est un mélange acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v).

L'éluant est versé dans la cuve chromatographique 30 mn avant l'introduction de la plaque pour saturer la cuve.

Sur la plaque CCM, la ligne de dépôt est à 1 cm du bord inférieur de la plaque. Les premier et dernier dépôts sont à 1cm des bords latéraux. Deux dépôts successifs sont espacés de 0.5 cm. L'application est répétée plusieurs fois au même point jusqu'à ce que la quantité déposée soit concentrée, et la largeur du dépôt est de 0,8 cm. La vérification de la concentration se fait sous lumière UV. Le dépôt entre chaque application est séché rapidement à l'aide d'un séchoir pour éviter une tache large.

La plaque est ensuite déposée verticalement dans la cuve que l'on couvre pendant le développement. Ce dernier est arrêté lorsque le front du solvant est à 1cm du bord supérieur de la plaque et la position du front est marquée.



Après développement, la plaque est séchée puis observée sous la lumière UV à la longueur d'onde  $\lambda = 254$  nm. Les couleurs des taches sont notées.

La révélation se fait ensuite à l'anisaldéhyde sulfurique à l'aide de pulvérisateur à air comprimé. Elle est suivie d'un séchage de la plaque à 100°C pendant 10 mn.

Chaque tache est représentée par son rapport frontal ou référence frontale notée Rf.

Pour un éluant et un support donnés, la Rf est caractéristique d'une substance donnée.

- **Évaluation**

Elle se fait par comparaison des profils chromatographiques de la solution de la mangiferine et/ou de celle de *A. theiformis* MBR et des échantillons:

- Sous lampe UV 254 nm : avant dérivatisation
- Sous lumière visible : après dérivatisation

Les paramètres d'évaluation sont :

- La référence frontale (Rf) ou position des taches sur la plaque
- L'intensité de la tache
- La couleur de la tache
- Le nombre de taches apparues

#### **III.2.4. Observation microscopique pour la détermination du type de stomates**

- **Méthodes**

Une petite quantité de poudre de *A. theiformis* est déposée sur une lame en y ajoutant quelques gouttes d'une solution d'hydrate chloral suivi d'un chauffage pour sécher. Une lamelle recouvre la préparation avant observation au microscope avec un grossissement 10x pour l'oculaire et 40x pour l'objectif soit un grossissement de 400x.

- **Evaluation**

La détermination de la caractéristique de stomates repose sur le nombre et la position des cellules annexes qui entourent les cellules stomatiques.

### III.2.5. Etude de l'activité hémolytique

Pour le test hémolytique, 1g de poudre de feuilles de *A. theiformis* est mis en solution dans 100 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 10 minutes. Après centrifugation à 2500 tours/mn, le surnageant est récupéré puis 3 gouttes de sang mélangées avec de l'EDTA y sont ajoutés. L'observation se fait après 30 mn.

Une solution témoin a été parallèlement préparée. Cette solution est un mélange d'eau distillée et de 3 gouttes de sang mélangées avec EDTA. L'aspect des 2 solutions est ensuite comparé.

### III.3. Validation de méthodes (13,46, 47)

Dans le cadre de la validation de méthodes d'identification, rappelons qu'il s'agit en premier lieu de développer une méthode par chromatographie sur couche mince (CCM) et en second, d'identifier au moyen d'un microscope le type de stomates présents dans les feuilles de *A. theiformis*.

#### • Méthode par CCM

##### ➤ Stabilité

Elle consiste à vérifier la stabilité de l'analyte dans le matériel végétal de référence:

- sur la plaque,
- dans la solution,
- pendant la chromatographie,
- après dérivatisation.

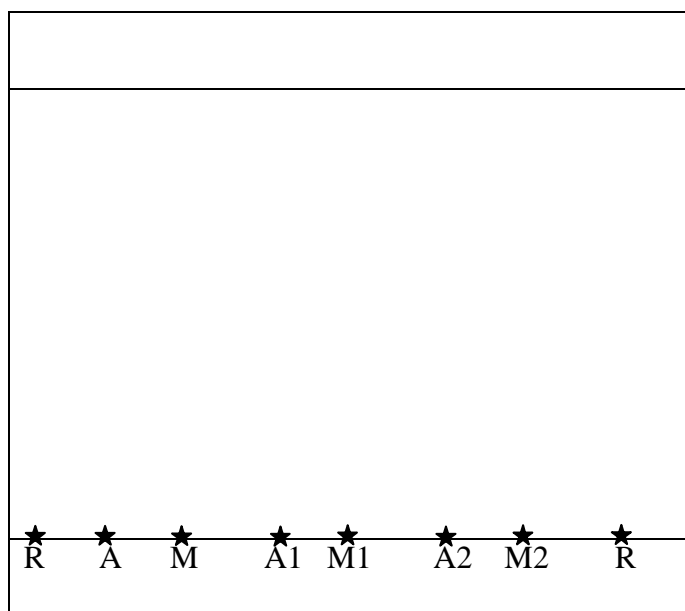
La stabilité est acceptée si le composé à analyser est stable:

- en solution pendant au moins une heure,
- sur la surface de la plaque pendant au moins 30 minutes,
- sur la plaque après migration pendant au moins une heure,
- pendant la migration si toutes les taches sont localisées sur la diagonale reliant le point d'application de spot et le point d'intersection du front des deux solvants.

▪ *Stabilité de l'analyte sur la plaque et dans la solution*

A l'aide d'un microcapillaire, 5µl de solutions de *A. theiformis* MBR et de *M. indica* sont déposées sur la plaque 3 h avant la migration. Juste avant le développement, sur la même plaque sont déposées :

- des mêmes volumes des mêmes solutions
- 5µl de deux solutions de *A. theiformis* MBR et de *M. indica* nouvellement préparées,
- 2µl de solution de mangiferine.



**Figure 5** : disposition des dépôts sur la plaque pour l'étude de la stabilité

R : mangiferine

A, M : solution de *A. theiformis* MBR et *M. indica* déposées 3 h avant développement de la plaque

A1, M1 : solution de *A. theiformis* MBR et *M. indica* laissée en solution durant 3h et déposée juste avant développement de la plaque

A2, M2 : solution de *A. theiformis* MBR et *M. indica* extemporanément préparés et déposés juste avant développement de la plaque

- *Stabilité de l'analyte durant la chromatographie*

Cette manipulation est propre à chaque type d'échantillons (*A. theiformis* MBR et *M. indica*). Pour évaluer cette stabilité, une CCM à deux dimensions a été faite.

5µl de la solution de *A. theiformis* MBR est appliquée sur la ligne de dépôt à 1cm du bord latéral gauche de la plaque de dimension 10x10cm. Après développement et séchage, la plaque est tournée à 90°C dans le sens contraire des aiguilles d'une montre puis introduite dans une cuve préalablement saturée avec le même éluant. La dérivatisation de la plaque suit la manipulation ; la même opération est effectuée avec la solution de *M. indica*.

- *Stabilité du résultat de la dérivatisation*

Les deux solutions de *A. theiformis* MBR et de *M. indica* sont chromatographiées sur une même plaque. La plaque est observée immédiatement après dérivatisation aux temps t=10, 30, 60 mn.

### ➤ **Spécificité**

La méthode est spécifique si les empreintes obtenues à partir de l'échantillon à identifier sont identiques à celles de *A. theiformis* MBR : même Rf, même intensité, même couleur et même nombre de taches.

- *Identification par comparaison du profil chromatographique d'un mélange de poudre de tiges/feuilles de *A. theiformis* avec celui de poudre de feuilles de *A.theiformis*.*

2 µl de la solution de mangiferine pur sont déposés sur la plaque en même temps que 5 µl des solutions d'extraits de feuilles de *A. theiformis* et d'extraits du mélange tiges/feuilles de *A. theiformis*. L'interprétation se fait après développement et dérivatisation.

- *Détection d'adultérant*

Dans le but de détecter d'éventuelles falsifications, le procédé d'analyse suivant a été fait : 2 µl de la solution de mangiferine pur sont déposés sur la plaque en même

temps que 5  $\mu$ l des solutions des extraits de feuilles de *A. theiformis*, de *M. indica* et d'une solution d'un extrait d'une plante quelconque comme témoin négatif.

### ➤ **Fidélité**

#### ▪ *Répétabilité*

Les résultats obtenus lors des tests de répétabilité sont dits répétables si toutes les taches sur chaque plaque sont identiques : même Rf, même nombre de taches, même position, même intensité, même couleur et  $\Delta Rf$  est inférieure ou égale à 0,05. Pour calculer la  $\Delta Rf$ , la Rf de la mangiferine est pris comme référence. Dans ce cas, la moyenne des Rf de mangiferine de chaque échantillon dans chaque série d'expériences est calculée. Les moyennes des Rf inter-séries (les séries d'expériences se déroulent le même jour) sont ensuite comparées, et si cette  $\Delta Rf$  est inférieure ou égale à 0,05, la méthode est dite répétable.

Sur trois plaques identiques, trois dépôts successifs de 2  $\mu$ l de la solution de mangiferine pur, trois dépôts successifs de 5  $\mu$ l de solution d'extrait de feuilles de *A. theiformis* et trois dépôts successifs de 5  $\mu$ l de solution d'extrait de feuilles de *M. indica* sont appliqués. Les trois plaques sont développées dans les mêmes conditions opératoires (même chambre, même solvant de migration)

Les moyennes des valeurs de Rf de mangiferine sont utilisées pour évaluer et valider la répétabilité de la méthode.

#### ▪ *Précision intermédiaire*

La précision intermédiaire est acceptable si:

- Toutes les empreintes des produits correspondants sur chaque plaque sont identiques : même Rf, même nombre de taches, même position, même intensité et même couleur,
- Après comparaison des Rf inter-jour (expériences déroulant dans des jours différents),  $\Delta Rf$  est inférieure ou égale à 0,05 en prenant comme référence les Rf de la mangiferine de chaque échantillon dans chaque série d'expériences.

L'étude de la précision intermédiaire se déroule sur trois jours. Le jour des expériences réalisées lors de l'étude de la répétabilité est pris comme Jour 1 (J1). Les

mêmes expériences sont réalisées à des jours différents notés Jour 2 (J2) et Jour 3 (J3) : 2 µl de la solution de mangiferine pur, 5µl de solution d'extrait de feuilles de *A. theiformis* et 5 µl de solution d'extrait de feuilles de *M. indica* sont déposés sur la même plaque. Les plaques sont développées dans les mêmes conditions opératoires (même chambre, même solvant de migration).

### ➤ **Robustesse**

Le test de robustesse consiste à comparer les profils chromatographiques des échantillons en faisant varier certains paramètres : type de la cuve, distance parcourue par le solvant de migration, température de la cuve lors du développement.

La robustesse est acceptable si:

- Toutes les empreintes chromatographiques des produits correspondants sur chaque plaque sont identiques : même  $R_f$ , même nombre de taches, même position, même intensité et même couleur,
- Après comparaison des  $R_f$ ,  $\Delta R_f$  est inférieure ou égale à 0,05

#### ▪ *Selon le type de la cuve*

Sur deux plaques identiques, 2 µl de la solution de mangiferine pur, 5µl de solution d'extrait de feuilles de *A. theiformis* et 5 µl de solution d'extrait de feuilles de *M. indica* sont déposés. Après développement et dérivatisation de chaque plaque, l'une dans une cuve à fond plat et l'autre, dans une cuve à 2 chambres, toutes deux de mêmes dimensions, la comparaison des taches sur le chromatogramme est étudiée.

#### ▪ *Selon la modification de la distance parcourue par le solvant*

Les mêmes dépôts que dans le cas précédent sont appliqués sur une plaque mais le développement est arrêté lorsque le front du solvant se trouve à 1.5cm du bord supérieur de la plaque.

#### ▪ *selon la température de la cuve pendant le développement*

Les mêmes manipulations que précédemment sont réalisées en maintenant la cuve CCM à des températures différentes 21°C et 31°C lors de la migration. La procédure de validation propose d'étudier l'influence de la température en opérant à +5°C et à -5°C

par rapport à la température à valider. Dans le cas de ce travail, les expériences ont été réalisées à la température de la salle, 26°C.

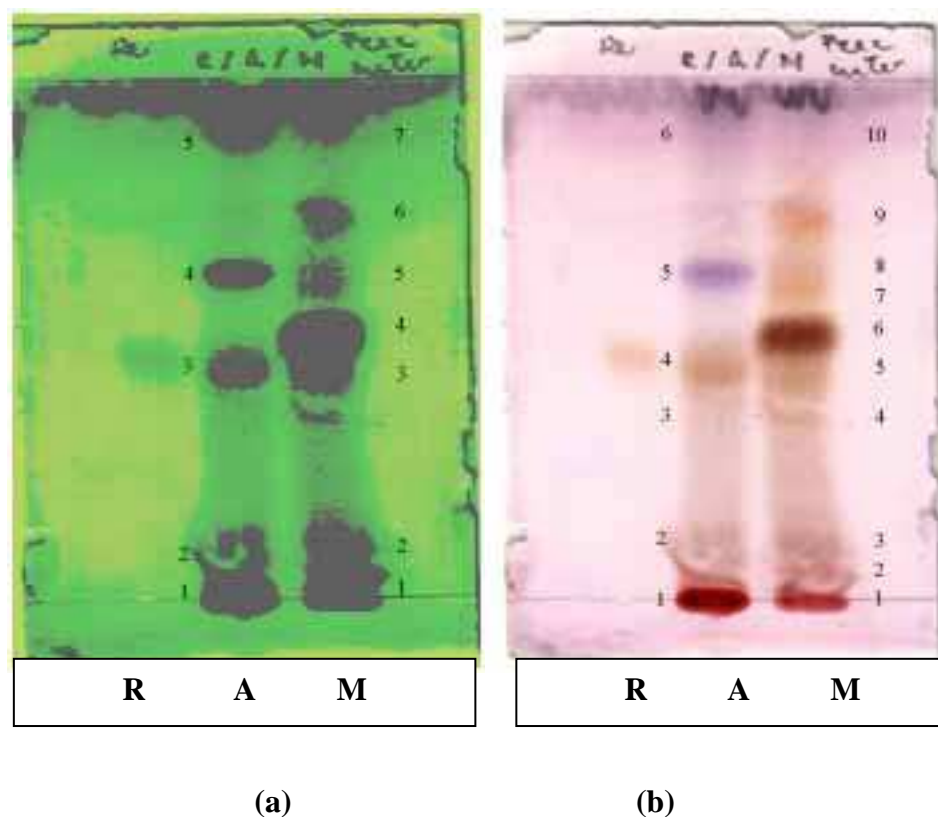
- Méthode de détermination du type de stomates

Cette méthode figure parmi les méthodes d'identification de pharmacognosie proposées par la Pharmacopée européenne. La procédure est déjà validée. Dans notre étude, il s'agit simplement de répéter la manipulation trois fois pour chaque échantillon analysé.

## IV. RESULTATS

### IV.1. Chromatographie de mangiferine, de *A. theiformis* MBR et de *M. indica*

Sur cette figure, trois dépôts sont appliqués sur la plaque CCM dont le premier correspond à la mangiferine, le second à une solution de *A. theiformis* MBR et le dernier à celle de *M. indica*.



**Figure 6:** chromatogrammes de mangiferine, *A. theiformis* MBR et *M. indica* :

(a) Observation à UV 254 nm ; (b) Observation après dérivatisation

Phase stationnaire : plaque CCM gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27)

**R:** mangiferine

**A:** *A. theiformis* MBR

**M:** *M. indica*



- *Sous la longueur d'onde 254nm*

**R** : La mangiferine apparaît sous forme de spot sombre sur fond vert fluorescent.

**A** : Le chromatogramme montre 5 taches sombres (numérotées de 1 à 5) sur fond vert fluorescent. La mangiferine a une Rf égale à 0,47.

**M** : Le chromatogramme montre 7 taches sombres (numérotées de 1 à 7) sur fond vert fluorescent. La tache correspondante à la Mangiferine a une Rf de 0,47.

- *Après révélation par anisaldéhyde sulfurique :*

**R**: la mangiferine se présente sous forme de spot jaune orangé à une Rf égale à 0,47.

**A** : le chromatogramme montre 6 taches sur la plaque.

**M** : le chromatogramme montre 10 taches sur la plaque.

Les Rf et couleurs correspondantes à chaque tache observée sont données dans le tableau III.

**Tableau III :** Résultats de CCM de mangiferine, des solutions, d'extraits de feuilles de *A. theiformis* MBR et de *M. indica*

	Observation sous UV 254 nm		Observation après dérivatisation		
	N° tache	Rf	N° tache	couleur	Rf
<b>A : <i>A. theiformis</i> MBR</b>	1	0,00	1	rouille	0,00
	2	0,10	2	gris-marron	0,10
	3	0,46	3	marron	0,40
	4	0,62	4	marron clair	0,46
	5	0,90	5	violet	0,62
			6	violet	0,94
<b>M : <i>M. indica</i></b>	1	0,00	1	rouille	0,00
	2	0,09	2	rouille	0,05
	3	0,45	3	gris-marron	0,10
	4	0,51	4	marron clair	0,36
	5	0,62	5	marron	0,45
	6	0,76	6	marron foncé	0,56
	7	0,90	7	marron clair	0,61
			8	violet	0,66
			9	marron foncé	0,75
			10	violet	0,91

N° : numéros

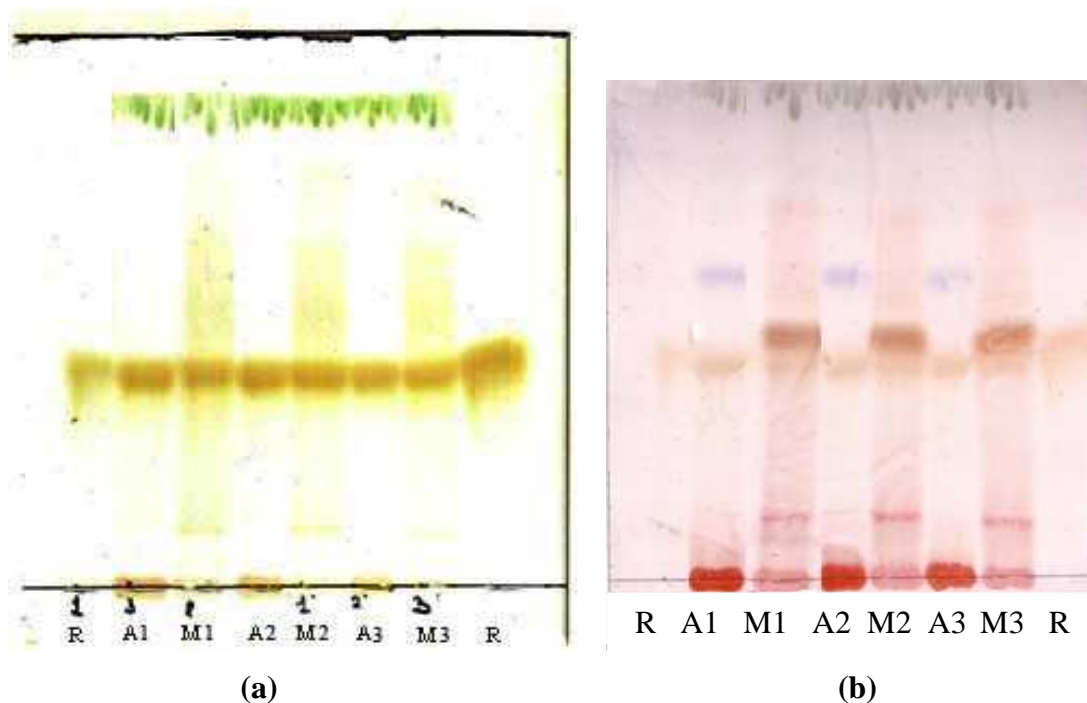
Rf : référence frontale

#### IV.2. Stabilité

Dans l'étude de la stabilité, il s'agit de vérifier la stabilité des analytes (mangiferine et les autres composés caractérisés sur la plaque) dans la solution et sur la plaque, durant la chromatographie et après dérivatisation.

#### IV.2.1. Stabilité de l'analyte dans la solution et sur la plaque

Aucune différence n'est observée dans les chromatogrammes concernant le nombre, la Rf, l'intensité et les couleurs des taches.



**Figure 7** : chromatogrammes CCM obtenus lors d'étude de la stabilité de l'analyte en solution et sur la plaque : (a) observation à la lumière visible ; (b) après dérivatisation par anisaldéhyde sulfurique

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R** : solution de mangiférine

**A1** : solution de *A. theiformis* MBR déposée puis laissée pendant 3 h sur la plaque avant la migration

**M1** : solution de *M. indica* déposée puis laissée pendant 3 h sur la plaque avant la migration

**A2** : solution de *A. theiformis* MBR laissée en solution pendant 3 h puis déposée sur la plaque avant la migration

**M2** : solution de *M. indica* laissée en solution pendant 3 h puis déposée sur la plaque juste avant la migration

**A3** : solution de *A. theiformis* MBR extemporanément préparée et déposée juste avant la migration

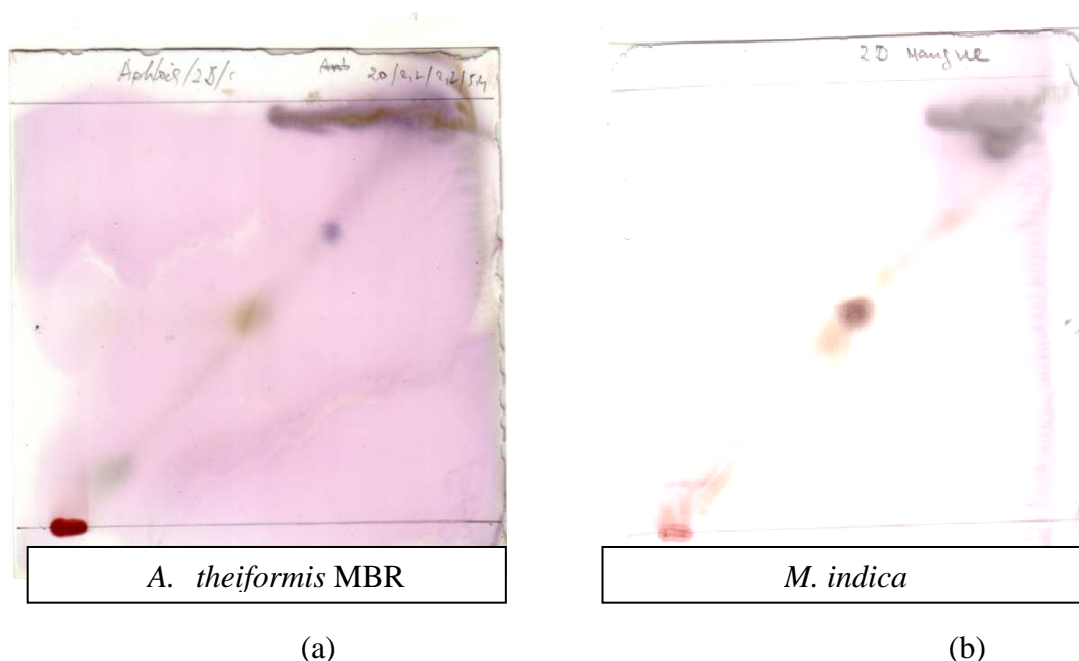
**M3** : solution de *M. indica* extemporanément préparée et déposée juste avant la migration

#### IV.2.2. Stabilité de l'analyte durant la chromatographie

Dans cette étude, il suffit de faire un dépôt de l'échantillon par plaque.

Sur la figure 8a, les taches sont alignées sur la diagonale,

Sur la figure 8b, les taches sont alignées sur la diagonale.



**Figure 8** : chromatogrammes CCM à 2 dimensions obtenus lors de l'étude de la stabilité de l'analyte durant la chromatographie: (a) *A. theiformis* MBR (b) *M. indica*

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

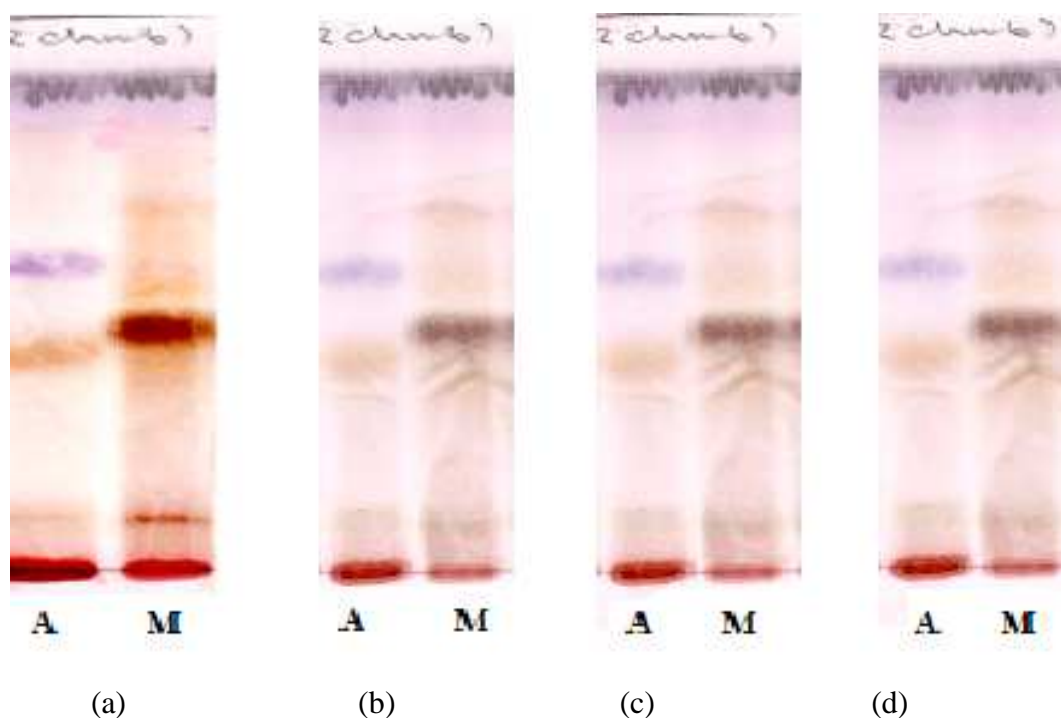
Révélateur : anisaldéhyde sulfurique

#### IV.2.3. Stabilité du chromatogramme après dérivatisation par l'anisaldéhyde sulfurique

La plaque, après dérivatisation, est observée durant 60 mn.

L'intensité de la coloration des taches diminue lentement durant les 10 premières

minutes mais aucune tache ne disparaît. De la 10ème minute jusqu'à la 60ème minute d'exposition à l'air libre, aucun changement n'est visiblement observé.



**Figure 9** : chromatogrammes CCM obtenus *A. theiformis* MBR et *M. indica* lors de l'étude de la stabilité après dérivatisation par anisaldéhyde sulfurique (a) immédiatement après dérivatisation ; (b) 10 min après dérivatisation ; (c) 30 min après dérivatisation ; (d) 60 min après dérivatisation

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

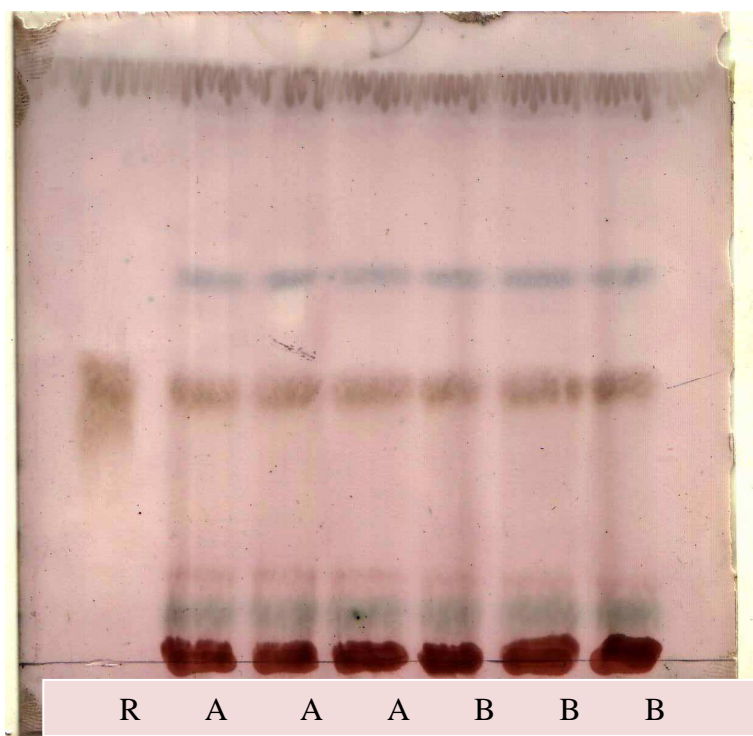
**A:** *A. theiformis* MBR

**M:** *M. indica*

Après avoir vu l'étude de la stabilité des constituants dans *A. theiformis* MBR, des études d'identification de *A. theiformis* échantillon par comparaison de leurs chromatogrammes avec *A. theiformis* MBR et d'identification des variétés de *M. indica* à chromatographier parmi les différentes variétés suivent la manipulation.

### Identification de *A. theiformis* échantillon en se référant avec *A. theiformis* MBR

Les chromatogrammes de l'échantillon de *A. theiformis* et de *A. theiformis* MBR sont remarquablement identiques : même Rf, mêmes couleurs, mêmes intensités et même nombre de taches.



**Figure 10 :** chromatogrammes de *A. theiformis* MBR et de *A. theiformis*

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ;  
v/v/v/v)

**R:** mangiferine

**A:** *A. theiformis* MBR

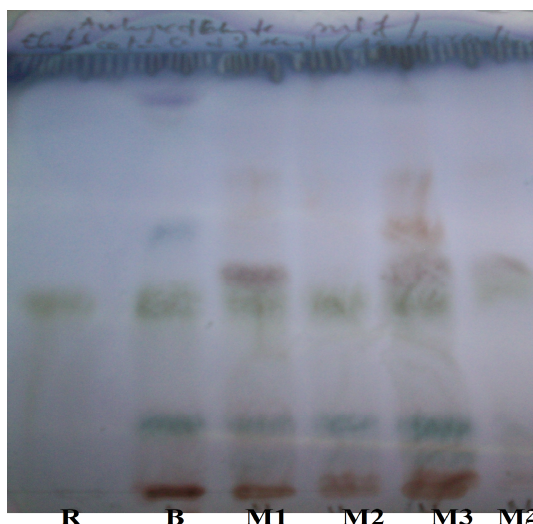
**B :** *A. theiformis*

### • Détermination des empreintes chromatographique des quatre variétés de *M. indica* en se référant sur la mangiferine

La mangiferine, *A. theiformis* échantillon et quatre variétés de *M. indica* sont chromatographiées sur une même plaque.

La mangiferine est présente dans les quatre variétés de *M. indica*. Ces variétés se différencient entre elles par la présence d'autres taches supplémentaires pour les autres.

Aucune des chromatogrammes des 4 variétés de manguier ne ressemble à celui de *A. theiformis*, mis à part la présence de la mangiférine.



**Figure 11** : chromatogrammes de mangiférine, de *A. theiformis* et de quatre variétés de *M. indica*

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R**: mangiférine

**A**: *A. theiformis* MBR

**B** : *A. theiformis*

**M<sub>1</sub>** : manga eso

**M<sub>2</sub>** : manga gasy

**M<sub>3</sub>** : manga diego

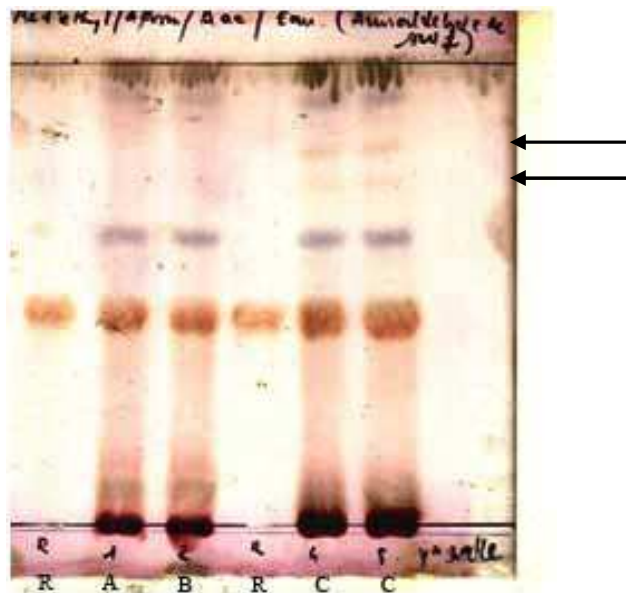
**M<sub>4</sub>** : manga vato

### IV.3. Spécificité

L'étude de la spécificité consiste à faire développer sur une même plaque, le produit de référence, l'échantillon à identifier et d'autres produits différents de ces derniers.

**IV.3.1. Identification de *A. theiformis* par comparaison des chromatogrammes de la mangiférine pure, de poudre de feuilles de *A. theiformis* et de poudre du mélange feuilles/tige de *A. theiformis***

La mangiferine est présente dans les empreintes chromatographiques correspondantes de **A**, **B** et **C**. Toutes les taches observées dans **A** se retrouvent dans **B** et **C**. Deux nouvelles taches à  $R_f$  0.74 et 0,80 sont observées dans **C**.



**Figure 12:** chromatogramme obtenu après dérivatisation par anisaldéhyde sulfurique lors de l'identification de *A. theiformis*

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R** : mangiferine

**A** : *A. theiformis* MBR

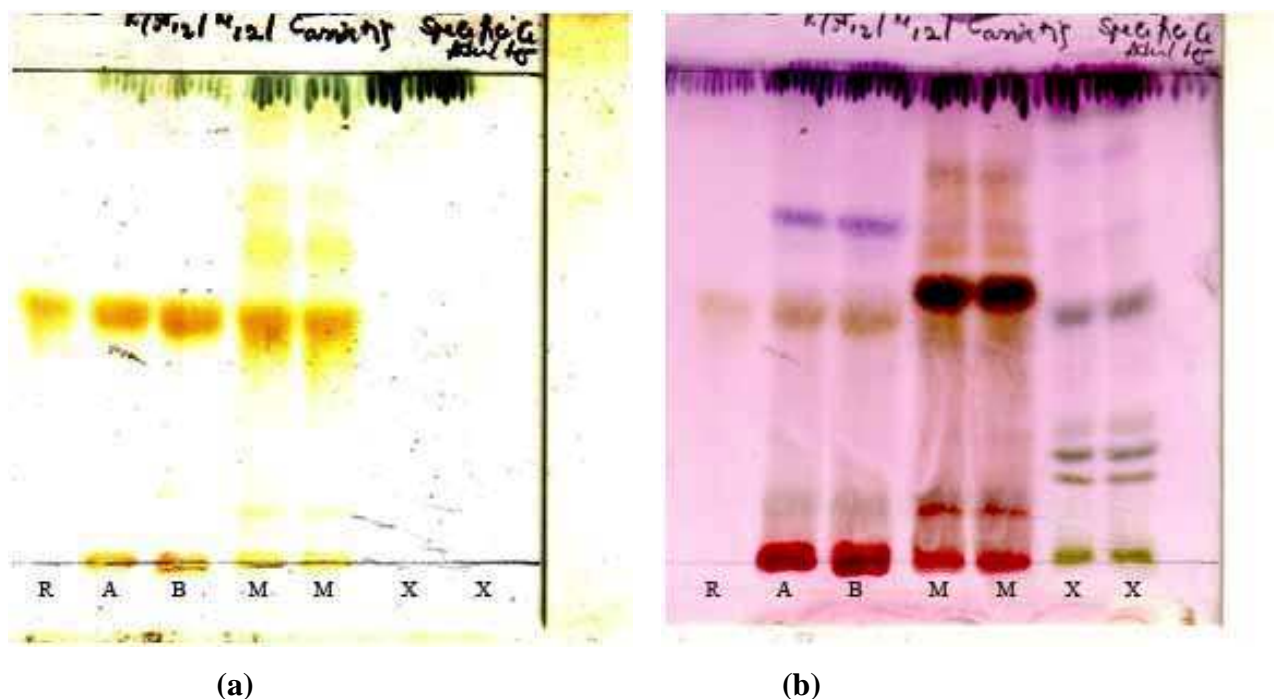
**B** : *A. theiformis* échantillon

**C** : mélange de feuilles/tige de *A. theiformis*

#### IV.3.2. Détection d'adultérant

Les figures 12a et 12b montrent que les chromatogrammes de R, A, B et M présentent la tache correspondante à la mangiferine ; cette tache est absente dans X. Le chromatogramme de **B** est identique à celui de **A** (*A. theiformis* MBR) : mêmes  $R_f$ , mêmes intensités, mêmes couleurs et même nombre de taches. Le chromatogramme de **X** est tout à fait différent de celui de **B**.





**Figure 13 :** chromatogramme CCM obtenu après dérivation par anisaldéhyde sulfurique lors de l'identification de *A. theiformis*

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R** : mangiferine

**A** : *A. theiformis* MBR

**B :** *A. theiformis* échantillon

**X** : plante quelconque

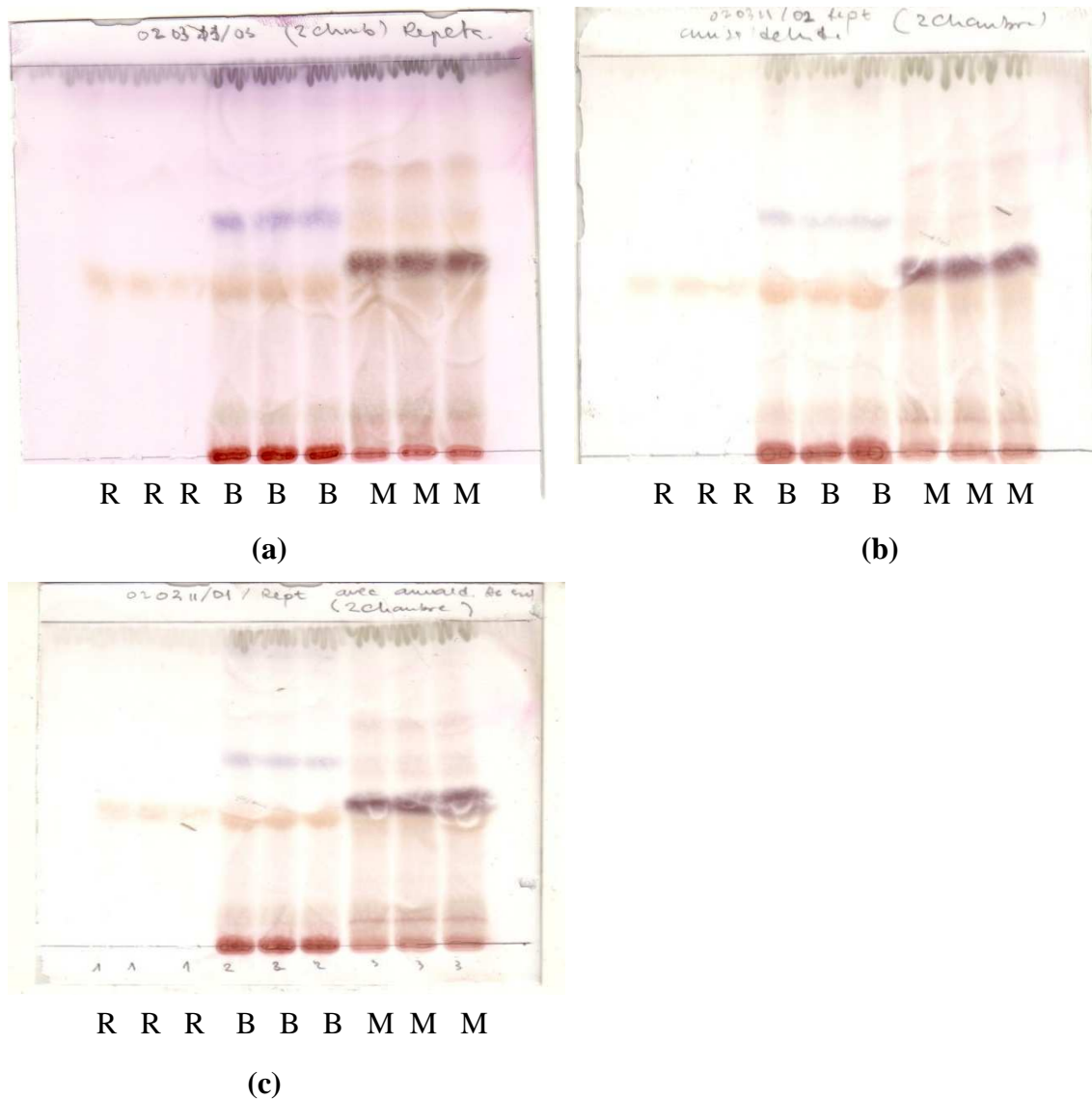
#### IV.4. Fidélité

La répétabilité et la précision intermédiaire sont des critères à évaluer dans la validation de la méthode par CCM. Elles consistent à réaliser la manipulation, sans modifier les conditions expérimentales (même opérateur, même échantillon, même conditions opératoires). Pour la répétabilité, les expériences se déroulent le même jour, et pour la précision intermédiaire, les expériences ont lieu à des jours différents.

#### **IV.4.1. Répétabilité**

En comparant les empreintes chromatographique inter-séries obtenues pour chaque produit, R, B et M, aucune différence significative n'est observée du point de vue couleur, intensité et nombre de taches observées (Figure 14).

Cependant, la comparaison des moyennes de Rf inter-séries obtenues montre une variation ( $\Delta R_f$ ) de l'ordre de 0,02 à 0,03. La  $\Delta R_f$  pour R, B et M ne dépasse pas 0,05 (Tableau IV).



**Figure 14** : chromatogrammes obtenus lors de l'étude de la répétabilité dans un court intervalle de temps : (a) série 1 ; (b) série 2 ; série 3

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R** : mangiferine

**B** : *A. theiformis* échantillon

**M** : *M. indica*

**Tableau IV :** Valeurs moyennes inter-séries de Rf de mangiferine et la différence des Rf notée  $\Delta Rf$

	Rf mangiferine			$\Delta Rf$
	Série 1	Série 2	Série 3	
mangiferine	0,46	0,43	0,44	0,03
<i>A. theiformis</i>	0,44	0,42	0,43	0,02
<i>M. indica</i>	0,45	0,43	0,43	0,02

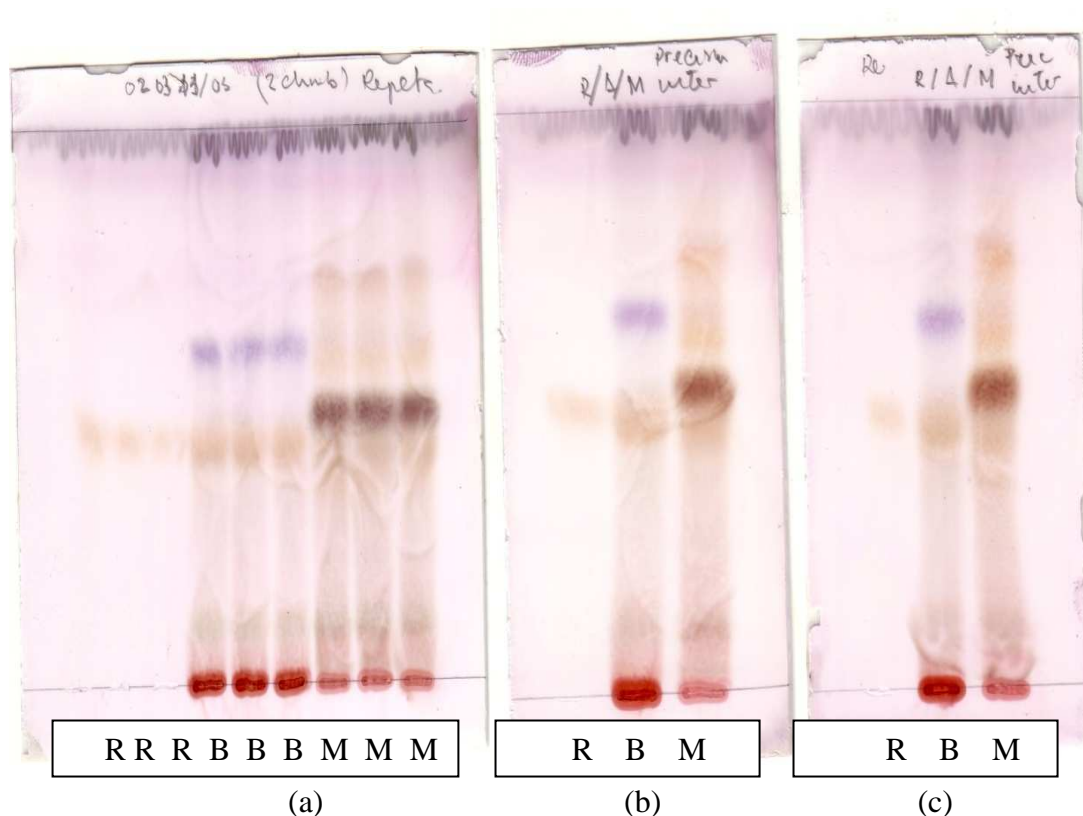
$\Delta Rf$  : écart entre la Rf maximale et la Rf minimale.

Rf : Référence frontale

#### IV.4.2. Précision intermédiaire

En comparant les empreintes chromatographiques inter-jour obtenues pour chaque produit, **R**, **B** et **M**, on n'observe pas de différence significative : couleur, intensité et nombre de taches observées (Figure 15).

Cependant, la comparaison des moyennes de  $R_f$  inter-séries obtenues montre une variation ( $\Delta R_f$ ) de l'ordre de 0,03 à 0,04. La  $\Delta R_f$  pour **R**, **B** et **M** ne dépasse pas 0,05 (Tableau V).



**Figure 15:** chromatogrammes CCM obtenus lors de l'étude la fidélité intermédiaire :

(a) jour 1 ; (b) jour 2 ; (c) jour 3

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R** : mangiferine

**B** : *A. theiformis* échantillon

**M**: *M. indica*

**Tableau V** : Valeurs inter-jour de Rf de mangiferine et la différence des Rf notée  $\Delta Rf$ 

	Rf Mangiferine			$\Delta Rf$
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	
mangiferine	0,44	0,47	0,46	0,03
<i>A. theiformis</i>	0,43	0,47	0,45	0,04
<i>M.indica</i>	0,43	0,46	0,45	0,03

$\Delta Rf$  : écart entre la Rf maximale et la Rf minimale.

Rf : Référence frontale

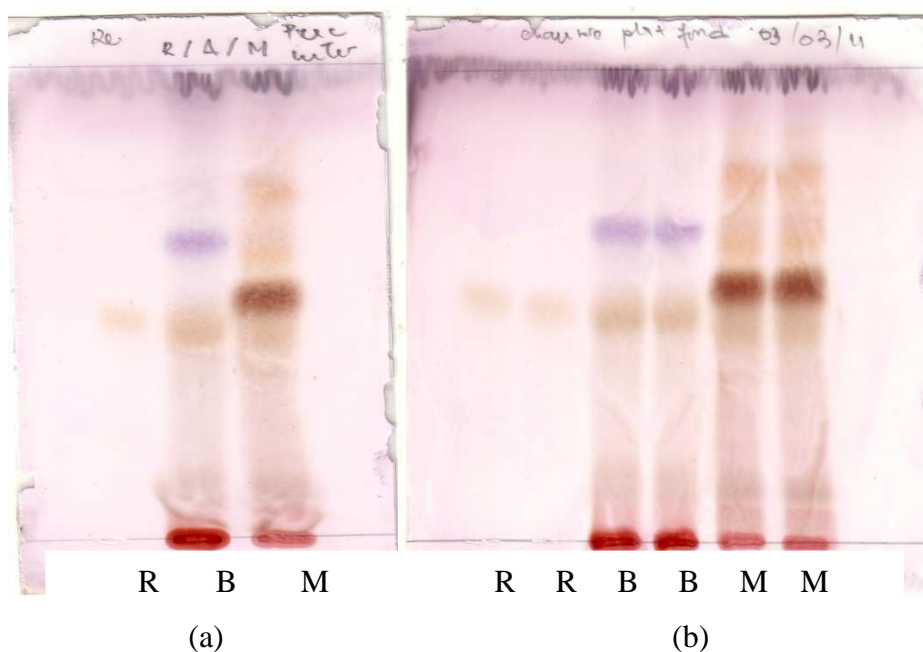
## IV.5. Robustesse

L'étude est basée sur l'observation d'éventuelles variations des critères d'évaluation de la méthode par CCM en faisant varier légèrement quelques paramètres chromatographiques à savoir le type de la cuve de développement, la distance parcourue par le solvant de migration et la température de la chambre lors du développement.

### IV.5.1. Évaluation de la robustesse selon le type de la cuve

Sur la figure, aucune différence significative n'est observée du point de vue : couleur, intensité, nombre et position de taches observées (Figure 16).

La comparaison des moyennes des  $R_f$  obtenues montre une variation ( $\Delta R_f$ ) de 0,04. La  $\Delta R_f$  pour **R**, **B** et **M** ne dépasse pas 0,05 (Tableau VI).



**Figure 16** : chromatogrammes CCM obtenus lors de l'étude de la robustesse selon le type de cuve utilisée : (a) cuve à deux chambres ; (b) cuve à fond plat

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R** : produit de référence

**B** : *A. theiformis*

**M** : *M. indica*

**Tableau VI :** Valeurs de Rf de mangiferine obtenues selon le type de cuve utilisée et la différence des Rf notée  $\Delta Rf$

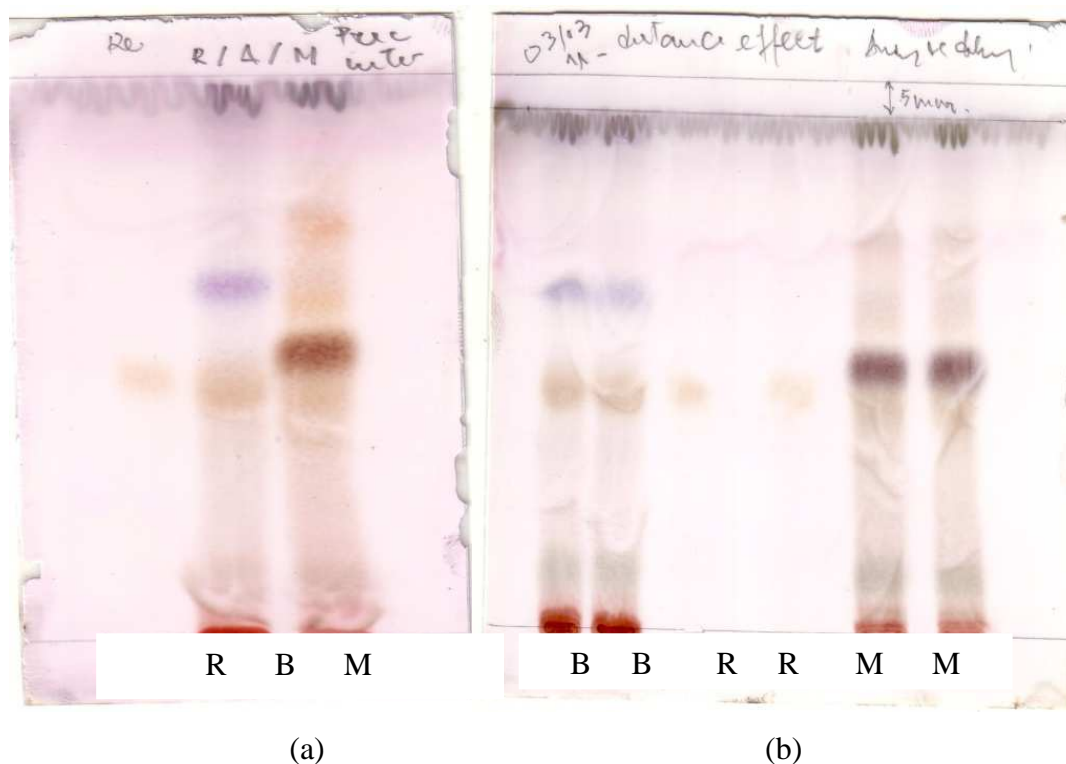
	Rf mangiferine		$\Delta Rf$
	Cuve à deux chambres	Cuve à fond plat	
mangiferine	0,44	0,48	0,04
<i>A. theiformis</i>	0,43	0,47	0,04
<i>M. indica</i>	0,43	0,47	0,04

$\Delta Rf$  : écart entre la Rf maximale et la Rf minimale.



#### IV.5.2. Evaluation de la robustesse en variant la distance parcourue (D) par le front du solvant

En comparant les empreintes chromatographiques obtenues selon la distance parcourue par le front du solvant et pour chaque produit **R**, **B** et **M**, on n'observe pas de différence significative : couleur, intensité et nombre de taches observées (Figure 17). La comparaison des moyennes de Rf obtenues montre une variation ( $\Delta R_f$ ) de 0,00 à 0,03. La  $\Delta R_f$  pour **R**, **B** et **M** ne dépasse pas 0,05 (Tableau VII).



**Figure 17** : chromatogrammes CCM obtenus lors de l'étude de la robustesse en modifiant la distance parcourue par le front du solvant : (a) D = 8cm ; (b) D = 7,5 cm

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R**: mangiferine

**B**: *A. theiformis*

**M**: *M. indica*

**Tableau VII :** Valeurs de Rf de mangiferine selon la distance parcourue par le front du solvant et la différence des Rf notée  $\Delta Rf$

	Rf mangiferine		$\Delta Rf$
	$D = 8\text{cm}$	$D = 7,5\text{cm}$	
Mangiferine	0,47	0,44	0,03
<i>A. theiformis</i>	0,45	0,43	0,02
<i>M. indica</i>	0,45	0,45	0,00

$\Delta Rf$  : écart entre la Rf maximale et la Rf minimale.

Rf : Référence frontale

#### IV.5.3. Influence de la température pendant le développement

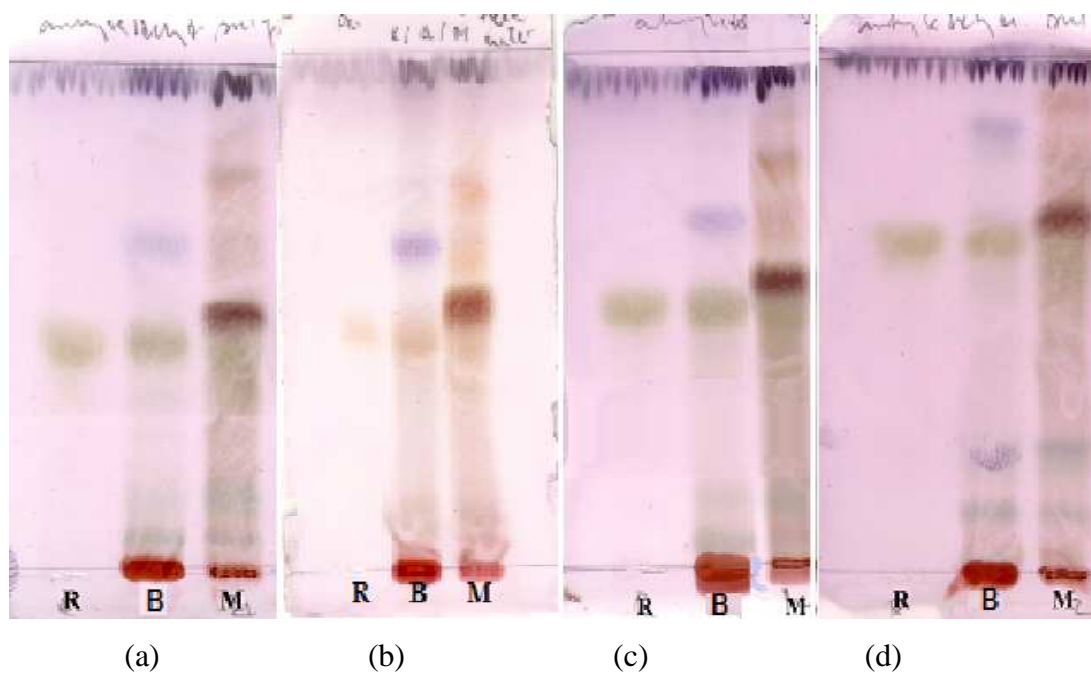
Dans cette étude, une petite modification est apportée sur les paramètres chromatographiques concernant la température du développement par rapport à la température ambiante (26°C).

En comparant les empreintes chromatographiques sur les deux plaques développées à des températures respectivement 21°C et 30°C à celle sur la plaque développée à 26°C :

- toutes les taches observées sur la plaque développée à la température 26°C sont retrouvées sur ces deux plaques, dont les couleurs, intensité, nombre, position des taches sont comparablement identiques.

- la comparaison de Rf de mangiferine des deux plaques (a et c) par rapport à celle de (b) montre une variation ( $\Delta Rf$ ) de 0,03 à 0,04. Les  $\Delta Rf$  pour **R**, **B** et **M** ne dépassent pas 0,05 (Tableau VIII)

Par contre, la Rf de la mangiferine sur la quatrième plaque (d) est considérablement élevée et égale à 0,60. En comparant avec celle de la plaque développée à 26°C, la  $\Delta Rf$  est égale à 0,14 à 0,16. Cette valeur est supérieure à 0,05, la limite maximale tolérée. Le nombre, la couleur et l'intensité des taches observées sont respectés.



**Figure 18** : chromatogrammes obtenus en faisant varier les températures de migration : (a) à 21°C ; (b) à 26°C, (c) à 31°C ; (d) à 40°C.

Phase stationnaire : gel de silice 60F<sub>254</sub>

Phase mobile : acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/27 ; v/v/v/v)

**R**: mangiferine

**B**: *A. theiformis*

**M**: *M. indica*

**Tableau VIII :** Valeurs de Rf de mangiferine en fonction de la température de migration

	Rf mangiferine				$\Delta Rf_1$	$\Delta Rf_2$	$\Delta Rf_3$
	T° :26°C	T° : 21°C	T° : 31°C	T° :40°C			
mangiferine	0,47	0,43	0.50	0.61	0,04	0.03	0.14
<i>A. theiformis</i>	0,45	0,42	0.49	0.61	0,03	0.04	0.16
<i>M. indica</i>	0,45	0,41	0.49	0.59	0,04	0.04	0.14

T° : température

Rf : Référence frontale

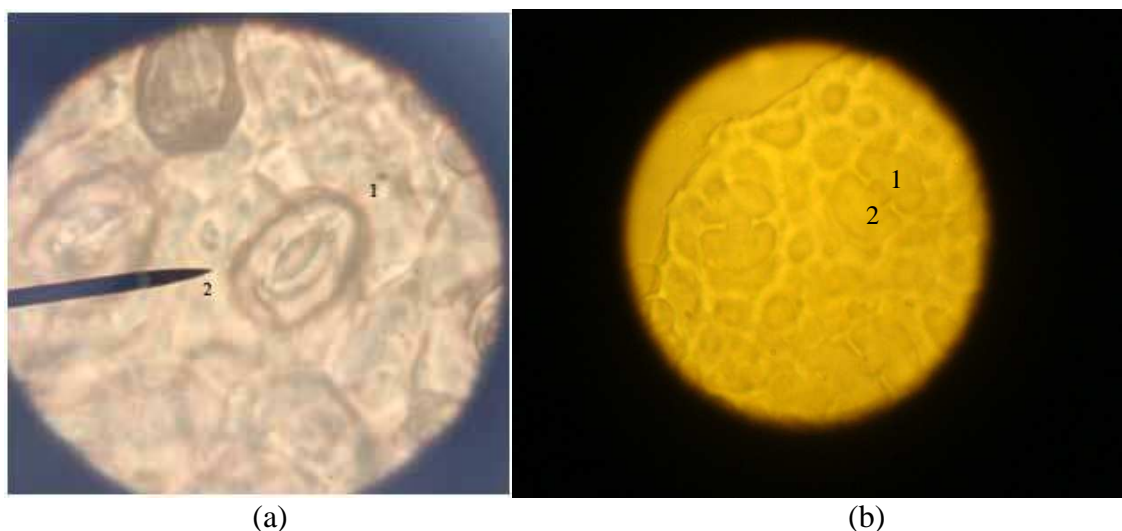
$\Delta Rf_1$  : différence entre Rf à 21°C et 26°C

$\Delta Rf_2$  : différence entre Rf à 31°C et 26°C

$\Delta Rf_3$  : différence entre Rf à 40°C et 26°C

#### IV.6. Détermination du type de stomates au microscope (Grossissement X 40)

L'observation au microscope de la poudre de feuilles de *A. theiformis* MBR (Figure 17a) et de la poudre de feuilles de *M. indica* (Figure, 17b) montre les deux cellules stomatiques entourées par deux cellules annexes notées **1** et **2**. Le résultat montre que le broyage électrique n'a pas détruit la structure des stomates présentes dans *A. theiformis* et *M. indica*.



**Figure 19** : poudre de feuilles montrant les stomates vue au microscope (grossissement X 400) : (a) *A. theiformis* MBR ; (b) *M. indica*

#### IV.7. Résultats du test hémolytique

Les globules rouges (GR) restent en suspension dans la solution témoin, tandis que l'extrait aqueux de *A. theiformis* présente un culot constitué par des débris membranaires. Donc, les saponines existantes dans les feuilles de *A. theiformis* sont hémolytiques.

## V. DISCUSSION

La technique d'identification utilisant la Chromatographie sur Couche Mince et la détermination du type des stomates est largement utilisée pour identifier une plante (47-49). Ces deux techniques d'identification sont couramment utilisées dans la pharmacopée européenne.

Le travail ci-présent a pour but de mettre au point et de valider une méthode d'identification de *A. theiformis* par CCM couplée à la détermination du type de stomates présents dans les feuilles des plantes. Ces deux méthodes sont choisies pour leur praticité et leur simplicité.

La méthode de CCM permet d'identifier la plante par son empreinte chromatographique en se référant à celle d'un matériel végétal pris pour référence (MBR). Le matériel végétal de référence est *A. theiformis*, notée *A. theiformis* MBR, identifiée par un botaniste de l'IMRA. Des volumes de solutions des deux plantes sont chromatographiés sur une même plaque CCM dans des conditions expérimentales identiques. Ensuite, la comparaison du comportement de chaque tache observée sur les deux chromatogrammes est faite : la référence frontale (Rf), la couleur, l'intensité et le nombre de taches observées.

La méthode de pharmacognosie passant par la détermination du type de stomates consiste à observer au microscope le type de stomates présents dans les feuilles de *A. theiformis* MBR et de *M. indica*, car le type de stomate est caractéristique d'une espèce.

### ➤ Analyses sur CCM

Les constituants dans les extraits de *A. theiformis* MBR et de *M. indica* sont visiblement séparés. Les chromatogrammes montrent des taches bien séparées avec leur Rf respectives. Ces conditions expérimentales sont ainsi retenues pour la suite de l'étude.

Dans un premier temps, l'étude de la stabilité est réalisée. Cette étude consiste dans les conditions expérimentales étudiées à voir le changement des caractéristiques

des analytes dans l'extrait de feuilles de *A. theiformis* MBR. La stabilité des analytes conditionne la validité de la méthode. L'étude de la stabilité est réalisée en deux étapes : étude de la stabilité des analytes en solution et sur la plaque, et étude de la stabilité des analytes durant la chromatographie.

Les chromatogrammes obtenus sont identiques, aucune différence n'est observée concernant les  $R_f$ , les couleurs, les intensités et le nombre des taches observées. Les analytes sont donc stables au moins 3 heures en solution et 3 heures sur la plaque avant la migration.

Les taches étant alignées sur la diagonale. Toutes les analytes dans l'échantillon sont stables dans les conditions expérimentales décrites(50).

L'observation de la plaque pendant 1 h après la dérivation à l'anisaldéhyde sulfurique montre que la coloration est stable mais l'intensité des couleurs des taches diminue dans les 10 premières minutes sans disparition complète des taches. Ainsi l'interprétation des résultats doit se faire pendant la première heure après dérivation. (50)

Le profil chromatographique de *A. theiformis* MBR est ainsi établi. Ce profil chromatographique a été utilisé pour identifier *A. theiformis* échantillon. La comparaison des deux profils chromatographiques n'a relevé aucune différence significative quant aux  $R_f$ , nombre, couleur et intensité des composés observés sur la plaque. L'échantillon *A. theiformis* est ainsi identifié comme *Aphloia theiformis*. Les chromatogrammes obtenus des 4 variétés de manguiers présentent la tache correspondante à la mangiférine, mais aucun de ces chromatogrammes ne ressemble à celui de *A. theiformis*. L'identification d'une plante à partir de son profil chromatographique doit prendre en compte tous les composés présents sur le chromatogramme et ne se limite pas à la caractérisation d'un seul produit ou d'une classe de substances.

La méthode d'identification étant mise au point, l'étape suivante consiste à la valider. La validation d'une méthode d'identification comprend plusieurs étapes dont l'étude de la spécificité, la fidélité et la robustesse.

Sur le chromatogramme du mélange feuilles/tiges de *A. theiformis*, les taches présentent sur le chromatogramme des feuilles de *A. theiformis* sont retrouvées avec deux taches supplémentaires aux Rf 0,73 et 0,83. En conséquence, ces résultats confirment que l'on a bien une poudre de feuilles de *A. theiformis* et que les deux taches seraient des impuretés apportées par les tiges. En analyse de routine, il n'est pas rare que les lots de feuilles à analyser contiennent des fragments de tiges. La présence de ces deux taches ne mettraient pas en cause l'identification de la plante comme *A. theiformis*. Le chromatogramme permet en plus d'évaluer la pureté de la matière première. Si d'autres taches, en plus de celles identifiées sur le chromatogramme obtenu avec le mélange feuilles/tiges de *A. theiformis* apparaissent, cela supposerait que l'échantillon contiendrait des adultérants.

La mangiferine est présente dans tous les échantillons sauf dans la poudre de feuilles d'une plante quelconque qui est utilisée en tant que témoin négatif dans cette étude. Si sur le chromatogramme de cette poudre non identifiée apparaissait une tache correspondante à la mangiferine, la méthode ne serait pas spécifique. Dans ce cas, une interprétation basée sur les autres taches doit être faite. Le cas échéant, un changement de l'éluant pour la CCM s'avèrerait nécessaire (50).

L'étude de la fidélité se fait en deux étapes : la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

Les chromatogrammes de mangiferine, de *A. theiformis* et de *M. indica* sont identiques quant aux Rf, aux intensités, aux couleurs et au nombre de taches observées. Par ailleurs, la variation de Rf étant comprise entre 0,02 et 0,03, soit  $\Delta Rf < 0,05$ . L'expérience est répétable.

En effectuant les mêmes analyses trois jours successifs (analyses inter-jours), les chromatogrammes obtenus sont identiques quant aux Rf, aux intensités, aux couleurs et au nombre de taches observées. La variation de Rf est comprise entre 0,03 et 0,04. Bien que cette variation soit légèrement supérieure à la précédente, elle reste toujours inférieure à 0,05. La méthode n'a pas une fidélité absolue ( $\Delta Rf \leq 0,01$ ) mais sa fidélité est bonne. Ainsi le résultat obtenu est valable quel que soit le jour de l'expérience et ceci dans le respect des conditions expérimentales décrites (50).



L'évaluation de la robustesse s'est faite en modifiant légèrement trois paramètres : le type de la cuve chromatographique utilisée, la distance parcourue par le front de l'éluant et la température.

Le changement de la cuve chromatographique n'affecte pas le chromatogramme obtenu. Toutefois, la comparaison des  $R_f$  des taches correspondantes à la mangiferine dans les deux cas montre une variation  $\Delta R_f$  de l'ordre de 0,04 qui est inférieure à 0,05. On note que les  $R_f$  obtenues avec la cuve à fond plat sont un peu élevées (50).

Concernant l'influence de la distance parcourue par le front du solvant sur les chromatogrammes, aucune différence notable n'est observée. Cependant, les  $R_f$  obtenues avec  $D = 7,5$  cm sont légèrement inférieures à celles obtenues avec  $D = 8$  cm avec une  $\Delta R_f$  de l'ordre de 0,03 (50).

L'influence de la température sur la méthode à valider a été étudiée. En faisant varier légèrement la température de la migration, température de la salle (26°C), températures maintenues à 31°C et 21°C, les empreintes chromatographiques ne présentent pas de différences significatives quant à la couleur, à l'intensité, au nombre, et à la position des taches avec  $\Delta R_f < 0,05$ . Les expériences ont été réalisées le même jour. La méthode par CCM est donc valide entre 21 °C et 31 °C.

Lorsque l'expérience est menée à 40°C, les empreintes chromatographiques sont sensiblement différentes à celles de la plaque développée à la température 26°C ; la différence concerne particulièrement la  $R_f$  des taches observées avec  $\Delta R_f > 0,1$  en prenant toujours comme référence la mangiferine, alors que la tolérance maximale est  $\Delta R_f \leq 0,05$ . La couleur, le nombre et l'intensité ne sont pratiquement pas modifiés. La méthode n'est pas valide à 40°C comme méthode d'identification.

Dans les trois cas,  $\Delta R_f$  étant toujours inférieure à 0,05, la méthode satisfait au test de la robustesse.

Des études récentes effectuées sur *A. theiformis* malgache et focalisées sur la teneur en mangiferine ont montré que cette teneur n'est pas affectée par la saison de récolte ni par l'endroit de culture. Cette étude a été faite de mars 2005 à février 2006 et conduite dans 5 endroits différents (51).

### ➤ Observation au microscope

L'observation au microscope au grossissement X 400 permet d'identifier les cellules stomatiques entourées par deux cellules annexes. Les stomates sont accompagnés par deux cellules annexes dont les parois communes font un angle droit avec les cellules de garde des stomates. Ces caractères correspondent au type de stomates diacytiques pour les feuilles de *A. theiformis*.

Pour le cas de *M. indica*, la disposition des 2 cellules stomatiques est parallèle à l'ostiole, le stomate est du type paracytique.

Les structures de tous les stomates observés sur la lame mince sont identiques, cela signifie que le broyage électrique n'a pas détruit la structure des stomates.

### ➤ Test hémolitique

Les résultats obtenus montrent que les saponines présentes dans les feuilles de *A. theiformis* sont hémolitiques. Certes, pour des sujets qui ne présentent pas des ulcères gastriques, les préparations à base des feuilles de *A. theiformis* ne sont pas toxiques car les saponines seront hydrolysées dans le tube digestif. Par contre, si la personne présente des ulcérations avec hémorragie interne, les préparations à base de *A. theiformis* sont à déconseiller.

En résumé, la méthode par CCM est valide dans les conditions suivantes :

- Extraction : l'extraction des feuilles doit suivre la procédure décrite dans le paragraphe
- Conditions chromatographiques : l'adsorbant doit être le silicagel 60F<sub>254</sub> et l'éluant est un mélange de acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau (100 :11 :11 :27 ; v/v/v/v). La cuve doit être saturée pendant 30 mn avant de mettre la plaque pour développement. La cuve à utiliser est à double fond et la température d'expériences est entre 21°C et 31°C. Les composés sont détectés à l'aide d'une lampe UV à 254 nm et révélés par anisaldéhyde sulfurique.

Cette méthode par CCM est complétée par la détermination du type de stomates.

## VI. CONCLUSION

La monographie d'une plante est un recueil d'informations sur la plante. Elle est destinée à garantir la qualité et le bon usage de cette plante. Dans le 1<sup>er</sup> volume de la pharmacopée nationale malgache, les monographies réservées aux plantes sont principalement des monographies d'usage. Les méthodes pour assurer la qualité de la plante, c'est à dire l'identification et la quantification du ou des principes actifs n'y sont pas assez développées.

Le présent travail a été focalisé sur le développement et la validation d'une méthode d'identification de *Aphloia theiformis*, une des plantes reconnues comme plante médicinale malgache. Cette méthode d'identification comprend la technique CCM et la détermination du type de stomates présents dans les feuilles de la plante. Ces deux techniques sont utilisées pour identifier les plantes dans la pharmacopée. Elles ont été choisies pour leur praticité et leur simplicité. La technique est moins coûteuse.

Dans les conditions expérimentales étudiées, les différents critères de validation pour une méthode par CCM sont satisfaits. L'analyte est stable, les résultats sont répétables, la méthode est spécifique et permet de détecter d'éventuelles falsifications. La méthode n'est pas significativement affectée par de faibles variations de paramètres d'analyses. La méthode d'identification par CCM est ainsi validée et pourra être utilisée comme méthode d'identification de référence pour identifier un échantillon de *Aphloia theiformis*.

La méthode par caractérisation du type de stomates est, par contre, déjà validée et proposée par la pharmacopée européenne. Elle est complémentaire à la technique CCM, et ensemble, les deux techniques peuvent constituer une méthode d'identification utilisable et fiable. Pour le cas de *A. theiformis*, les stomates sont du type diacytique.

Les expériences réalisées dans ce travail de thèse nous ont permis :

- d'une part, d'appliquer les acquis théoriques que nous avons reçus au cours de notre formation,
- d'autre part, de contribuer à l'élaboration de la monographie de *Aphloia theiformis*. La méthode validée dans ce travail servira de méthode d'identification de référence pour *A. theiformis* ; L'approche peut bien être utilisée pour d'autres plantes.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Ganzhorn JU, Lowry PP, Schatz GE, Sommer S. The biodiversity of Madagascar. One the world's hottest hotpots on its way out. ORYX, 2001; 4: 346-8.
- 2 Debray M, Jacquemin H, Razafindrabao R. Plante médicinale du monde France : ORSTOM, 1971 ; 150 : 10.
- 3 OMS. African traditional medicine. Afro technical Report. OMS, 1976 ; p.1.
- 4 Hostettmann K. Les plantes médicinales : de l'usage traditionnel aux médecines modernes. Switzerland : Institut de pharmacognosie et phytochimie. 2000 ; 1 : 43.
- 5 Min. San. PF, SPMT. Vers une Pharmacopée Malagasy, monographie d'usage. Min. San. PF, 2009 ; 1 : 77.
- 6 OMS. Stratégie de l'OMS pour la Médecine traditionnelle. OMS. 2002; 1: 63.
- 7 Ioset JR, Raoelison GE, Hostettmann K. Detection of aristolochic acid in Chinese Phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. Food and Chemical Toxicology. 2003; 41: 29-36.
- 8 Talamond P, Mondolot L. First report on mangiferine isolated from leaves of a wild coffee plant, coffee pseudozanguebaria. Acta Botanica Gallica. 2008; 55: 513-9.
- 9 OMS. Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle. OMS ; 2002.
- 10 Pharmacopée Européenne. Définition de la plante médicinale. Pharmacopée Européenne, 6<sup>ème</sup> éd; 2008. p.1433.

- 11 Mahuzier G, Hamon M. Abrégé de la chimie analytique. 2<sup>ème</sup> éd. Paris. Masson; 1990. p. 177-81.
- 12 Skoog DA, West DM, Holler FJ. Chimie analytique. 7<sup>ème</sup> éd. Bruxelles: De Boeck universitaire ; 1997. p.660-701.
- 13 Eike R, Schibli A. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal plants. Ed. New York-Stuttgart : Thienne; 2007. p.196-240, 188, 199, 247, 150-3, 248-9, 250-3, 254-5, 255-6.
- 14 Pharmacopée Européenne. Méthode de pharmacognosie. Détermination du type de stomate. Pharmacopée Européenne. 4<sup>ème</sup> éd; 2002. p.193.
- 15 George E, Scartz. Flore générique des arbres de Madagascar. Royal botanical garden and missouri botanical Garden 2001; 52:..503.
- 16 Boiteau P. Dictionnaire des noms malgaches des végétaux Fitoterapia. Invernì della beffa, melano-via ripamonte 1999 ; 4 : 50.
- 17 Applamdom Réunion. Plante médicinale de Piton Mon-Vert .[http ://www.applamdom.org](http://www.applamdom.org). 2009.
- 18 Paris R. A Flacourtiaceae from Madagascar “voafotsy”. Bull scoparmacologie 1949; 50: 156.
- 19 Pernet R, Mayer G. Pharmacopée de Madagascar. Institut de recherche scientifique Tananarive 1957; 86 : 16,25-7.
- 20 Perrier H. 140ème famille Flacourtiaceae : Flore de Madagascar et des Comores, Paris. H. Humbert ; 1946. p.1.

- 21 Hostettmann K, Hostettmann M. Xanthones, Methods in Plant Biochemistry. London: Harbone J B; 1989. p.493.
- 22 Sarath P, Gunasekera, Uvais S M, Sultanrawa, Sinnathamby B. Triterpenes of some species of Flacourtiaceae. Phytochemistry 1977; 16: 788-9.
- 23 Shashi B, Mahato, Ashoke K, Nandy. Triterpenoid saponins discovered between 1987 and 1989. Phytochemistry 1991; 30:1357-90.
- 24 Gopalsamy N, Ricaud C, Vargas D, Joseph G, Hostettmann K. Saponins from leaves of *Aphloia theiformis*. Phytochemistry 1988; 27: 3593-5.
- 25 Schneider E. La santé, ça se mange. Hambourg. Vie et santé. 1985. p.143-5.
- 26 Wauthoz N, Balde A. Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. Bark and Pharmacological Studies of its Main C-Glucosylxanthone, mangiferin. Global scienc books 2007; 33: 112-8.
- 27 Coe FG, Anderson GJ. Screening of medicinal plants used by the Garífuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds. Journal of Ethnopharmacology 1996; 53: 29–50.
- 28 *Mangifera indica* <http://www.jardinsdumonde.org>. Consulté en octobre 2010
- 29 Danthu P, Lubrano C, Flavet L, Rahajanirina V, Behra O, Fromagest C, Rabevohitra R, Roger E. Biological Factors Influencing Production of Xanthones in *Aphloia theiformis*. Chemistry and Biodiversity 2010; 7: 104-50.
- 30 Andriantsiferana R. Action de la mangiferine (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-C-glucoside) sur le métabolisme de l'eau. Académie des Sciences 1998; 9 : 1215-8.

- 31 Rivera DG, Balmaseda IH, Leon AA, Hernandez BC, Montiel LM, Garrido GG, Cuzzocrea S, Hernandez RD. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang®) and contribution of its glucosyl xanthone mangiferin. J Pharma Pharmacol 2006; 58: 385-92.
- 32 Stoilova I, Gargova S, Stoyanova A. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. Herbal Polonica 2005; 51: 37- 44.
- 33 Poullain C, Valenciennes E, Smadja J. Plants from Reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. J Ethnopharmacol 2004; 45:19-26.
- 34 Sanchez GM, Giuliani A, Leon-Fernandez OS. Protective effects of *Mangifera indica* L extract, mangiferine and selected antioxydants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. Pharmacol Research 2000; 42:565-73.
- 35 Yoshimi N, Matsunaga K, Katayama M, Yamada Y, Kuno T, Qiao Z, et al. The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. Cancer Letters 2001; 65: 163-70.
- 36 Chen C, Kong T. Dietary cancer-chemoprevention compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. Pharmacological Sciences 2005; 26: 318-26.
- 37 Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. Chemotherapy 1996; 42: 443-51.

- 38 Zhu XM, Song JX, Huang ZZ, Whu YM, Yu MJ. Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 in vitro. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 1993; 14: 452-4.
- 39 Zheng MS, Lu ZY. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chinese Medical Journal* 1990; 103:160-5.
- 40 Perrucci S, Fichi G, Buggiani C, Rossi G, Flamini G. Efficacy of mangiferin against *Cryptosporidium parvum* in a neonatal mouse model. *Parasitology Research* 2006; 99: 184-8.
- 41 Muruganandan S, Scrinivasan K, Gupta S, PK Gupta, Lal J. Effet de la mangiferine sur l'hyperglycémie et du diabète. *Journal 'Ethnopharmacol* 2005; 97: 497-501.
- 42 Miura T, Iwamoto N. The suppressive effect of mangiferin with exercise on blood lipids in type 2 diabetes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2001; 24: 1091-2.
- 43 Merck E. Révélateurs pour la Chromatographie sur Couche Mince et sur Papier. Francfort (Allemagne fédérale) : Grafis ; 1998. p.152.
- 44 Educnet. Fiches de TP de chimie. <http://www.educnet.fr>, 2011.
- 45 Marston A, Hostettmann K. Counter-current chromatography as a preparative tool applications and perspectives. *Journal of Chromatography* 1994; p.315-41.
- 46 ICH Q2 (R1). Validation of analytical procedures, ICH Q2. 1996.
- 47 Bernard-Savary P. Chromatographie Couche Mince Haute Performance et transposition en Chromatographie préparative. Lyon. Symposium CPE; 2009.



- 48 Danthu P, Lubrano C, Flavet L, Rahajanirina V, Behra O, Fromageot C, et al. Biological factors influencing production of Xanthones in *Aphloia theiformis*. Chemistry and Biodiversity 2010; 7: 140-8.
49. Ioset JR, Raoelison GE, Hostettmann K. Method for the rapid detection of aristolalic acid in Plant preparations. Planta Medica 2003; 68: 856-8.
- 50 Pharmacopée Européenne. Passiflore. 4ème éd; 2002. p. 1854-5.

**VELIRANO  
(SERMENT DE GALIEN)**

Mianiana aho, eto anatrehan'ireo mpampianatra rehetra ato amin'ny sampam-pampianarana momba ny fahasalamana sy ny filan-kevitra ao amin'ny aro fenitrin'ny farmasianina ary ireo mpiara-mianatra amiko rehetra, fa :

- Hanome voninahitra ao anatin'ny fitsipika mifehy ny asako ireo rehetra namolavola sy nanofana ahy ary hahatsiaro mandrakariva ny soa lehibe nataon'izy ireo ka hitandro hatrany ny fampianarana nomeny ahy
- Hanatanteraka ny asako am-pahamendrehana sy am-pahamalinana ary am-pahamarinana ka tsy hanararaotra na hitady tombony mihoatran'izay lazain'ny lalàna ary hanaja an-tsakany sy an-davany ny lalàna rehetra manankery mifehy izany mba ho tombon-tsoa ambon'ny fahasalamam-bahoaka
- Tsy hanadino mihitsy ny adidy amanan-draikitra amin'ireo marary sy ny hasin'ny maha-olona
- Tsy hanaiky mihitsy hampiasa ny fahalalako sy ny fahefako mba ho fitaovana handikana ny maha-olona sy hanatanterahana heloka famonoana olona na amin'inona na amin'inona ary na rahoviana na rahoviana

Enga anie mba ho hajain'ny mpiara-monina aho raha manaja an-tsakany sy an-davany izao fiainianako izao, fa kosa ho feno henatra sy ho halan'ireo mpiara-miasa raha tsy manaja izany.

**PERMIS D'IMPRIMER**

LU ET APPROUVE

Le Président de Thèse

Signé : Professeur RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothée

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Doyen de la Faculté de Médecine d'Antananarivo

Signé : Professeur RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa

**Name and first name:** RAKOTOARISOA Tsirahonananarivo

**Title of Thesis :** Contribution to the establishment of the monography of *A.theiformis*: development and validation of the identification method.

**Heading :** QUALITY INSURANCE

**Number of pages : 60**                      **Number of photo** : 2

**Number of figures : 19**                      **Number of bibliographic references** : 48

**Number of tables : 8**                      **Number of webographic references** : 2

### SUMMARY

Phytotherapy is the study of the use of extracts from natural origin as medicines or health-promoting agents. With the 20th century came the development of synthesization techniques and totally synthetic drugs, causing phytotherapy to fall out of popularity. However, plants still have a very important place in medicine, and they will continue to do so well into the foreseeable future. For this reason, phytotherapy is recognized as conventional form of therapy in the national public health policy and monographies of 20 medicinal plants were established. Quality and safety are also important issues in phytotherapy. This study aimed to complete monography of *Aphloia theiformis* (FLACOURTIACEAE), a largely used medicinal plant in Madagascar by developing and validating an identification method of *A. theiformis*. The method is based on the characterization of the chemical features on thin layer chromatography of the leaves extract and the determination of the type of the stomata. Chromatographic profile on thin layer chromatography of the leaves extract was then established. The analytes show to be stable under the experimental conditions and the method is selective. The  $\Delta R_f$  for repeatability and intermediate precision did not exceed the acceptance limit at 0.05. This proposed method allows to identify the plant material *A. theiformis*, to determine its purity and to detect adulteration.

**Key word** : medicinal plant, *Aphloia theiformis*, aphloiol, quality control, identification , validation

**Director of thesis** : Professor RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothee

**Reporter of Thesis** : Doctor RAOELISON Emmanuel Guy

**Address of author** : lot II F 3Y AE Bis Antsahameva Andraisoro

**Nom et Prénom** : RAKOTOARISOA Tsirahonananarivo

**Titre de thèse** : Contribution à l'établissement de la monographie de *Aphloia theiformis* : développement et validation d'une méthode d'identification

**Rubrique** : ASSURANCE QUALITE

**Nombre de pages** : 60 **Nombre de photos** : 2

**Nombre de figures** : 19 **Nombre de références bibliographiques** : 48

**Nombre de tableaux** : 8 **Nombre de références webographiques** : 2

## RESUME

Un recueil de monographies d'usage d'une vingtaine de plantes a été édité et sorti par le Ministère de la Santé Publique malgache en vue de l'élaboration de la première pharmacopée malgache. La monographie d'usage de la plante *Aphloia theiformis* (FLACOURTIACEAE), qui fait l'objet de ce travail en fait partie. Ce travail a pour but d' étoffer cette monographie. Il consiste à développer et à valider une méthode d'identification de *A. theiformis* à partir de la poudre des feuilles. Cette méthode d'identification est basée sur les caractéristiques chimiques des extraits des feuilles sur chromatographie sur couche mince, d'une part, et sur le type de stomates présents dans les feuilles, d'autre part. Au terme de cette étude et dans les conditions expérimentales étudiées, l'empreinte chromatographique caractéristique de l'extrait de feuilles est établie. Les analytes présents dans l'extrait sont stables. La méthode est jugée fidèle et spécifique. Elle satisfait aux tests de la robustesse. La méthode d'identification sur chromatographie sur couche mince est ainsi validée. Les stomates présents dans les feuilles sont du type diacytique. La méthode ci-présente est proposée pour identifier la plante, pour déterminer sa pureté, et éventuellement pour détecter des falsifications. Ce travail s'inscrit dans le cadre de contrôle de qualité des produits de santé.

**Mots clés** : plante médicinale, *Aphloia theiformis*, aphloiol, contrôle qualité, identification, validation

**Directeur de Thèse** : Professeur RAZAFIMAHEFA RAMILISON Dorothée

**Rapporteur de Thèse** : Docteur RAOELISON Emmanuel Guy

**Adresse de l'auteur** : lot II F 3Y AE Bis Antsahameva Andraisoro