

REMERCIEMENTS

	SOMMAIRE	PAGES
INTRODUCTION.....	1	
PREMIERE PARTIE : PRESENTATION DES MILIEUX.....	1	
I- PRESENTATION DES MILIEUX D'ETUDE.....	3	
A- SITUATION ADMINISTRATIVE.....	3	
B- SITUATION GEOGRAPHIQUE.....	4	
1- LOCALISATION GEOGRAPHIQUE.....	4	
II- MILIEUX PHYSIQUES.....	5	
1- TOPOGRAPHIE.....	5	
2- GEOLOGIE.....	5	
3- SOL.....	6	
4 – HYDROLOGIE.....	6	
5- CLIMAT.....	7	
III- MILIEUX BIOTIQUES.....	9	
A- FLORE.....	9	
B- LA FAUNE.....	10	
C- CADRE HUMAIN.....	11	
D- TYPOLOGIE.....	12	
E- LES MENACES.....	12	
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES.....	14	
II-1- MATERIELS.....	14	
II-1-1- POSITION SYSTEMATIQUE.....	14	
II-1-2- DESCRIPTION.....	16	
II-1-3- COLLECTE ET IDENTIFICATION DES PLANTES MEDICINALES.....	16	
II-1-4- CHOIX DE L'ESPECE A ETUDIER.....	17	
II-2- METHODES.....	18	
II-2-1- ETUDE CARTOGRAPHIQUE.....	18	
II-2-2- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18	
II-2-3- ETUDES ETHNOBOTANIQUES.....	18	

A-	CHOIX ET LOCALISATION DES LIEUX D'ETUDE.....	18
B-	ENQUETES ETHNOBOTANIQUES.....	18
C-	CATEGORIES D'INFORMATEURS.....	19
II-2-4-	ETUDES DES PLANTES MEDICINALES.....	20
II-2-4-1-	PREPARATION DES EXTRAITS BRUTS VEGETAUX.....	20
II-2-4-2-	PREPARATION DES EXTRAITS POUR LE CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE.....	20
II-2-4-3 -	PREPARATION DES EXTRAITS POUR LE TEST DE CYTOTOXICITE.....	20
A-	ETUDES CHIMIQUES.....	21
1-	CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE.....	21
1.1-	PREPARATION DES REACTIFS.....	21
1.2-	CRIBLAGE DES ALCALOÏDES.....	23
1.2.1-	Macération chlorhydrique.....	23
1.2.2-	Test préliminaire.....	23
1.3-	CRIBLAGE DES FLAVONOÏDES ET DES LEUCANTHOCYANES.....	23
1.4-	CRIBLAGE DES TANINS ET DES POLYPHENOLS.....	24
1.5-	CRIBLAGE DES QUINONES.....	25
1.6-	CRIBLAGE DES STEROIDES ET DES TERPENOÏDES.....	25
1.7-	CRIBLAGE DES SAPONINES.....	26
1.8-	CRIBLAGE DES POLYSACCHARIDES.....	26
1.9-	TEST D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	26
B-	ETUDES PHARMACOLOGIQUES.....	27
1-	ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIPALUDIQUE.....	27
1.1-	TEST IN VITRO ANTIPALUDIQUE CHEZ LA SOURIS.....	28
1.2-	PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	28
1.2.1-	Préparation des souris donneuses.....	28
1.2.2-	Infestation des souris.....	29
1.2.3-	Traitement des souris infectées.....	29
2-	ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIHISTAMINIQUE.....	30
2.1-	TEST ANTIHISTAMINIQUE IN VITRO CHEZ LE COBAYE.....	31
2.1.1-	Préparation de milieu de survie de Krebs.....	31

2.1.2- Prélèvement, préparation et montage d'organe : Trachée de cobaye.....	31
2.1.3- Précontraction de la trachée par l'histamine et Test de relaxation.....	31
C- ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE : TEST DE CYTOTOXICITE.....	32
1. PREPARATION DES SOLUTIONS D'EXTRAITS VEGETAUX.....	32
1.1- CULTURE CELLULAIRE.....	32
1.1.1- LIGNEE CELLULAIRE.....	32
1.1.2- CULTURE DES CELLULES.....	32
1.2- Evaluation de l'activité cytotoxique : Détermination de CI50.....	35
1.2.1- Evaluation de la viabilité cellulaire.....	36
1.2.2- Expression des résultats : Évaluation de la CI50.....	37
TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....	38
I- ENQUETES ETHNOBOTANIQUES.....	38
A- RECENSEMENT DES PLANTES MEDICINALES DANS LES SITES D'ETUDES.....	38
B- MODE D'UTILISATION TRADITIONNELLE.....	39
II- ETUDES CHIMIQUES.....	39
A- CRIBLAGES PHYTOCHIMIQUES.....	39
B- ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	40
III- ETUDES PHARMACOLOGIQUES.....	42
A- ACTIVITE ANTIPALUDIQUE.....	42
B- TEST ANTIHISTAMINIQUE.....	42
C- TEST DE CYTOTOXICITE.....	43
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSIONS.....	46
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	48
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	50

ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I : Catégories et nombres des personnes enquêtées.....	19
Tableau II : Caractéristiques de l' <i>Hydrostachys plumosa</i>	39
Tableau III . Criblage phytochimiques de l' <i>Hydrostachys plumosa</i>	41
Tableau IV : Activité cytotoxique de l' <i>Hydrostachys plumosa</i> vis-à-vis des cellules P388.....	43

LISTE DES TABLEAUX

Listes des figures

Fig.1 : Carte de localisation des zones d'étude	3
Fig.2 : Carte hydrographique de la Région SOFIA.....	6
Fig.3 : Diagramme ombrothermique de la Région SOFIA.....	8
Fig.4. Effet relaxant de l'extrait de l' <i>Hydrostachys plumosa</i> vis-à-vis de la trachée de cobaye précontractée par l'histamine.....	42
Fig.5. Effet cytotoxique de différents extraits de l' <i>Hydrostachys plumosa</i> vis-à-vis des cellules P388.....	44

INTRODUCTION

L'être humain dépend de la biodiversité à beaucoup d'égards, à la fois pour satisfaire ses besoins primaires tel que, se nourrir et se soigner et aussi pour s'enrichir culturellement et spirituellement.

Le recours aux plantes dans les pratiques médicales est sans doute aussi vieux que l'humanité et il n'existe pas encore de nos jours, de population ou de communautés qui ne font pas état d'une pharmacopée populaire, écrite ou orale, basée sur l'usage des plantes de leur environnement [H.JOSEPH, P.BOURGEOIS, J.PORTECOP ; 2006].

La majeure partie de la population malgache utilise les plantes pour se soigner. Elles sont facilement disponibles et peu coûteuses.

Région SOFIA est réputée par ses couvertures forestières denses. Malheureusement, avec les feux de brousse incessants, l'exploitation forestière à outrance et les cultures sur brûlis, ces forêts sont actuellement dégradées, ne laissant apparaître que des lambeaux forestiers bien localisés. La croissance démographique n'était pas accompagnée par une croissance économique adéquate, d'où le recours à l'exploitation irrationnelle des ressources naturelles, y compris celles utilisées pour la nourriture et la santé.

De ce fait, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a lancé un programme pour les pays en développement pour augmenter l'autosuffisance en matière de santé telle que "la gestion de l'utilisation des plantes médicinale". Selon cet organisme, au moins 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour les soins de santé primaire [VANHAELEN et al, 1995].

Madagascar est concerné par ce programme car les malgaches dépendent des plantes médicinales et de la médecine traditionnelle. Les plantes médicinales sont toutes ou partie des plantes qui possèdent des vertus curatives ou préventives à l'égard des maladies de l'être humain ou des animaux prouvées ou reconnues traditionnellement. Ces plantes constituent certes, une source importante de molécules à visée thérapeutique mais les substances actives végétales sont le plus souvent, utilisées sous formes de mélanges complexes dont on ignore dans la majorité des cas les principes actifs et leurs mécanismes d'actions ainsi que leurs effets secondaires et éventuelles toxicités.

Dans ce contexte, la Faculté des Sciences de l'Université de Mahajanga par l'intermédiaire de l'option "Valorisation de la Biodiversité Végétale (VBV)" effectue des études axées sur la "Valorisation des plantes médicinales aquatiques à

Madagascar". Elles s'inscrivent dans le cadre d'un projet financé par M.A.D.E.S et sont réalisées en partenariat avec l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) d'Antananarivo.

Ainsi, le présent travail porte sur la "**Valorisation de la biodiversité végétale aquatique de la région SOFIA par des études phytochimiques et ethnopharmacologiques de l'*Hydrostachys plumosa* A. Juss. Ex Tul. (HYDROSTACHYACEAE)**". Son objectif principal est d'établir une relation entre les connaissances traditionnelles et scientifiques afin de mieux appréhender l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle malgache.

Après enquête ethnobotanique auprès des différentes catégories sociales et ethniques de la zone de Mandritsara, Antsohihy et Port-Bergé, des études d'activités antipaludique, antihistaminique et cytotoxique ont été effectuées afin d'affirmer ou de confirmer scientifiquement, les vertus thérapeutiques recueillies sur cette plante qui est couramment utilisée par la population de la région SOFIA.

I- PRESENTATION DES MILIEUX D'ETUDE

A- SITUATION ADMINISTRATIVE

Notre étude a été effectuée dans la partie Nord Ouest de Madagascar, plus précisément dans les districts de Mandritsara, d'Antsohihy et de Port-Bergé dans la province de Mahajanga. Ces trois sites font partie de la Région SOFIA.

La région SOFIA fait partie des quatre Régions qui composent l'ancienne province de Mahajanga. Elle est géographiquement la plus grande et la plus peuplée [<http://sofia-sim.org/index.php?id=306>].



Figure1 : Carte de localisation des zones d'étude

[[http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_\(r%C3%A9gion\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_(r%C3%A9gion))]

Le District de Mandritsara, avec ses 28 communes, est le plus grand de la Région; le plus petit est celui de Mampikony, avec seulement 10 Communes.

La Région SOFIA est un regroupement de deux zones de planification :

- ✓ La partie Est, Befandriana, est composée de Bealanana, Befandriana et Mandritsara.
- ✓ La partie Ouest, Antsohihy, est composée d'Analalava, Antsohihy, Port-Bergé et Mampikony [[http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_\(r%C3%A9gion\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_(r%C3%A9gion))]

La région est composée de sept districts et 108 communes :

- Analalava (13 communes)
- Antsohihy (12 communes)
- Bealanana (13 communes)
- Befandriana Avaratra (12 communes)
- Boriziny ou Port Bergé (15 communes)
- Mampikony (communes)
- Mandritsara (28 communes)

B- SITUATION GEOGRAPHIQUE

1- LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

La Région SOFIA se trouve sur la côte Nord-Ouest de Madagascar. Elle fait partie de la Province de Mahajanga (Fig1). S'étendant entre la 14° et 17° latitude Sud et 47° et 49° longitude Est, elle constitue un vaste territoire d'une superficie de 52.504 km², soit à peu près 8,5% de la Grande Ile et 33,4% de la Province. Le Chef-lieu de la Région, Antsohihy se situe à 440 km environ de Mahajanga, sur la RN6 qui rejoint Antsiranana. Elle est délimitée par les Régions de SAVA et DIANA au Nord, par ANALANJIROFO et ALAOTRA MANGORO à l'Est, par BETSIBOKA au Sud, par BOENY au Sud-Ouest et par le canal de Mozambique à l'Ouest.

- ✓ La capitale est Antsohihy au centre, comme chef-lieu de Région,
- ✓ Analalava à l'Ouest,
- ✓ Port-bergé, Mampikony au Sud
- ✓ et Bealanana, Befandriana, Mandritsara, à l'Est.

II- MILIEUX PHYSIQUES

1- TOPOGRAPHIE

La Région SOFIA met en évidence trois ensembles bien distincts : les plateaux, la plaine et le littoral.

a- Les plateaux

Il s'agit de plateaux gréseux et basaltiques, très disséqués par l'érosion avec des vallées étroites portant une forêt sèche sur des sols ferrugineux lessivés ou des dalles basaltiques peu aptes aux cultures.

b- La plaine

La zone basse, inférieure à 1000 m d'altitude se trouve au pied du massif de Tsaratanana.

- ✓ A l'Est, s'étend un couloir dépressionnaire, constitué d'une mosaïque de cuvettes, de lacs et de "baiboho", fortement alimenté en eau et alluvionné périodiquement par les deux grands fleuves de la Loza et de la SOFIA.
- ✓ Au Sud, prédominent les "baiboho" qui s'étendent vers l'Ouest sur le plateau de Bongolava.

c- Le littoral

Il est formé par des plaines côtières et de côtes d'une longueur de 450 Km, lesquelles se trouvent parsemées de formes volcaniques boisées. Les apports continentaux des fleuves ainsi que le niveau des marées y ont développé des vases salées, colonisées par la mangrove favorable au développement de la pêche.

[[http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_\(r%C3%A9gion\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_(r%C3%A9gion))]

2- GEOLOGIE

La Région SOFIA est formée essentiellement par deux types de terrains: les terrains cristallins et les terrains sédimentaires.

Les terrains cristallins qui constituent l'essentiel des paysages à l'intérieur de la Région. Les terrains sédimentaires qui couvrent la zone côtière et s'avancent

même à l'intérieur pour former des plateaux à faible altitude.
[http://www.sofia.gov.mg/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=12]

3- SOL

On observe différents types de sols dans la Région SOFIA, il s'agit

- ✓ d'un complexe de sols ferrugineux,
- ✓ un complexe de lithosols,
- ✓ sols calcimorphes, sols hydromorphes, une association sols ferralitiques jaune/rouge + rouge , sols ferralitiques rouge + jaune/rouge, des sols salés et de mangrove aux embouchures des fleuves, des sols ferrugineux tropicaux, des sols sableux, des sols ferralitiques rouges.

4 – HYDROLOGIE

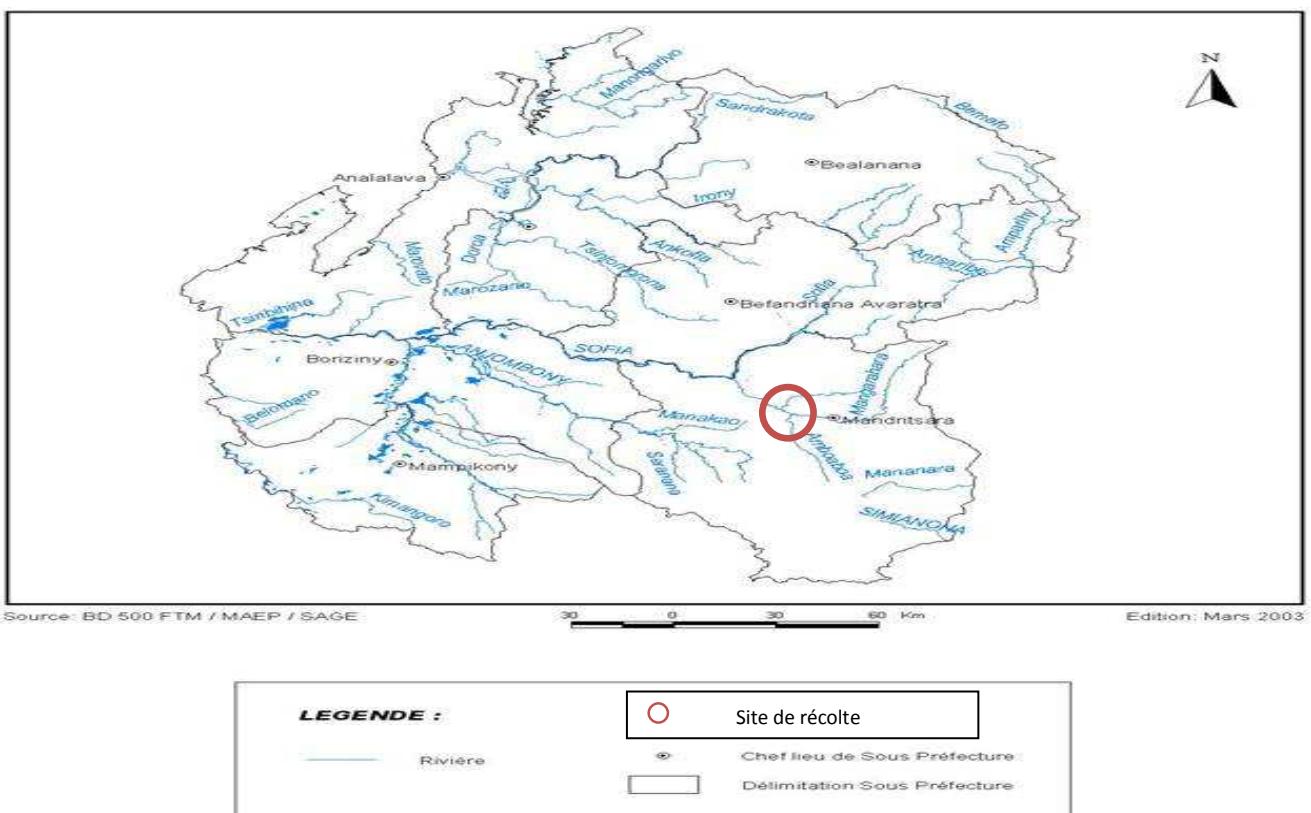


Figure2 : Carte hydrographique de la Région SOFIA

Direction Régionale de Développement rural de SOFIA

5- CLIMAT

Le climat est de type sub-semi humide, caractérisé par deux saisons bien distinctes :

- ✓ une saison sèche de mois de Mai à Novembre,
- ✓ une saison humide de mois de Décembre à Avril.

Ce climat varie suivant l'altitude, les plateaux Nord étant moins arrosés et plus frais que les zones littorales. Il fait plus chaud sur les côtes que sur les plateaux (Bealanana - Mandritsara).

a. Température

La température varie suivant le climat et l'altitude. Elle est nettement élevée sur les zones côtières, où la température annuelle moyenne atteint 26°C.

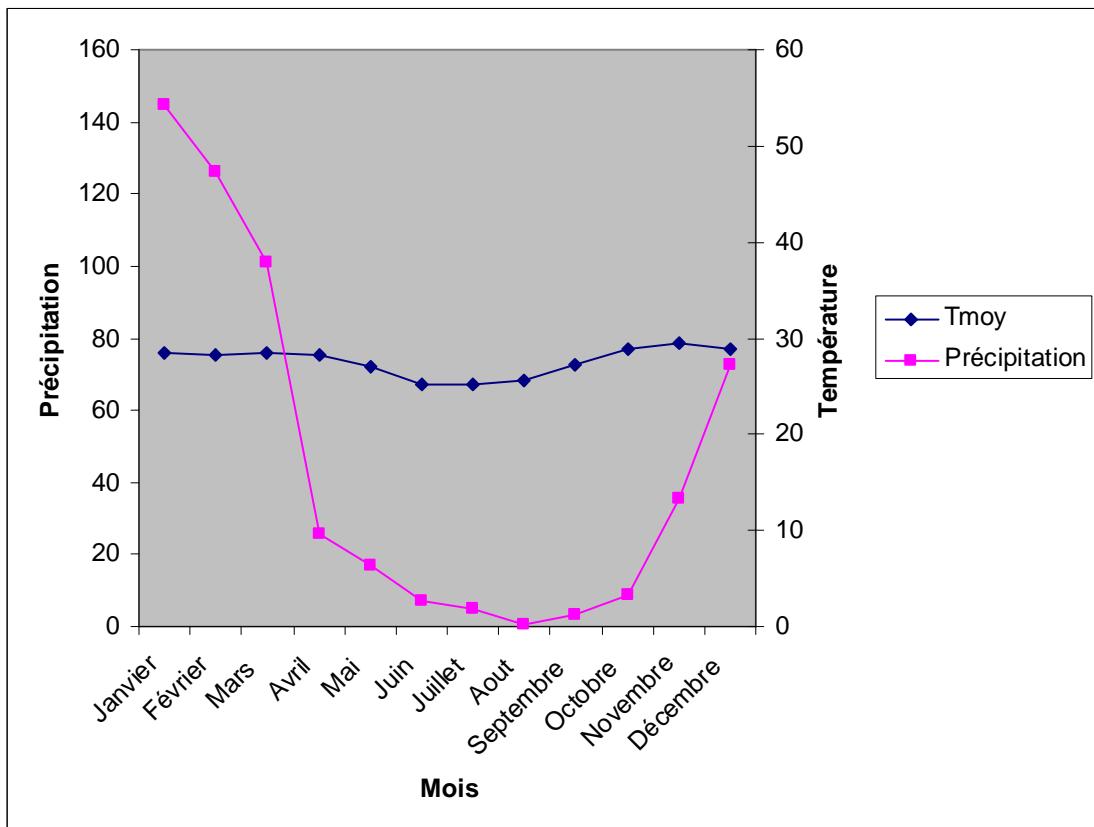
En saison sèche, elle descend jusqu'à 13,7 °C à Bealanana qui se trouve à 1125 m d'altitude et de 12,7 °C à Mangindrano, au pied du massif Tsaratanana.

Dans le District de Bealanana, on observe une partie où la température peut descendre en dessous de 20 °C (à Mangindrano : 12,7 °C).

[[http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_\(r%C3%A9gion\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_(r%C3%A9gion))]

b- Pluviométrie

La pluviométrie est caractérisée par une forte irrégularité. La saison humide commence en général au mois de décembre. Les pluies se concentrent sur 4 mois de l'année (décembre à avril). On peut assister à des précipitations violentes de quelques heures pendant la journée. Dans l'ensemble, la variation des pluies est moins nette et la pluviométrie annuelle varie de 1100 à 1900 mm.



**Figure 3 : Diagramme ombrothermique de la Région SOFIA
(Année 2004 - 2008)**

c- Vent

La Région est soumise aux vents humides et réguliers de l'alizé “varatrazza”, qui souffle en permanence dans la direction Sud-Est à Est et de la mousson “talio”, vent de direction Ouest-Est. L'alizé trop précoce peut diminuer la production du riz, en perturbant sa floraison.

La saison sèche d'avril en octobre est nettement propice aux vents qui soufflent à plus de 10 Km/h sur terre, leur vitesse peut dépasser 20 Km/h en mer, avec un maximum en novembre.

III – MILIEUX BIOTIQUES

A- FLORE

La Région SOFIA est réputée par ses couvertures forestières denses. Malheureusement, avec les feux de brousse incessants, l'exploitation forestière à outrance et les cultures sur brûlis, ces forêts se trouvent actuellement dégradées, ne laissant apparaître que des lambeaux forestiers bien localisés.

On peut distinguer :

- ✓ des forêts denses ombrophiles de moyenne altitude sur les montagnes,
- ✓ une forêt dense à mousses et lichens sur le massif de Tsaratanana ,
- ✓ des forêts denses caducifoliées sur les plateaux,
- ✓ des savanes herbeuses de l'Ouest à *Hyparrhenia rufa*,
- ✓ des savanes arbustives ou à palmiers,
- ✓ des “savoka” (forêts secondaires après défrichement) presque partout dans la Région,
- ✓ des savanes et steppes à *Aristida*,
- ✓ des savanes herbeuses du Moyen-Ouest,
- ✓ des mangroves aux embouchures des fleuves
[[http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_\(r%C3%A9gion\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Sofia_(r%C3%A9gion))]

La Région SOFIA compte aussi quelques rares forêts “classées”. Parmi ces forêts restantes, on peut citer :

- ✓ la réserve spéciale d'Ambohiviny Marotandrano (Mandritsara),
- ✓ et les forêts de Makiry et de Sahamalaza.

a- Les Mangroves

La superficie des mangroves est estimée à environ 10.000 ha. La mangrove côtière de la côte de Maromandia couvre environ 8000 ha, dont 3000 ha pour le delta de la rivière Andranomalaza. Les mangroves constituent également une bande à épaisseur variable, qui enveloppe toute la presqu'île de Sahamalaza.

b- Les forêts littorales

L'inventaire floristique des forêts de la presqu'île de Sahamalaza a permis de recenser 220 espèces regroupées dans 68 familles, dont 56 sont des Dicotylédones,

10 des Monocotyledones et 2 des Fougères. Le taux d'endémisme à Madagascar est de 42,2%.

B- LA FAUNE

a- Les mammifères

Elles sont concentrées dans la partie Nord-Est de la presqu'île de Sahamalaza. Six (6) autres espèces de lémuriens sont également rapportées. On y trouve aussi le *Fossa*, la plus grande espèce de carnivore de Madagascar.

La Réserve Spéciale Tampoketsa Analamaintso se situe dans la partie Nord de Madagascar, elle a 17 150 Ha à cheval sur les trois districts : Port Bergé, Mandritsara et Mampikony.

La faune de ce Réserve Spéciale recèle bien des trésors. On y rencontre des familles d'arthropodes comme les Gasteracanthinae, qui ont une certaine affinité africaine, les Scaritidae, avec des genres endémiques de Madagascar et les Monommidae, typiques des régions tropicales. Elle est assez riche en herpétofaunes. Vingt-quatre (24) espèces ont été répertoriées dont 23 sont endémiques de Madagascar.

Deux espèces particulières de reptiles ont été rencontrées : les caméléons *Brookesia decaryi* et *Calumna boettgeri*.

Ces deux espèces sont endémiques de cette Région du Nord.

La faune aviaire est diversifiée Réserve Spéciale Tampoketsa Analamaintso renferme une faune aviaire diversifiée avec un taux d'endémisme de 49,05%.

Trois (3) espèces de micromammifères ont été répertoriées à Tampoketsa Analamaintso. La présence de ***Rattus rattus*** est très forte, signe de la dégradation des formations.

Chez les lémuriens, trois espèces ont été recensées dans la forêt de Tampoketsa Analamaintso : le ***Microcebus rufus***, le ***Cheirogalus sp*** et l'***Eulemur fulvus fulvus*** [<http://www.sofia.gov.mg>].

b- L'avifaune

L'inventaire des oiseaux de la forêt d'Analavory a aboutit à quarante et une (41) espèces d'oiseaux, dont 16 sont endémiques à Madagascar, 14 sont endémiques à la région des Mascareignes et 11 sont non endémiques.

Parmi les espèces endémiques recensées on trouve le *Newtonia brunnericauda*, le *Coua cristata*, le *Buteo brachypterus*, le *Lophotibis cristata*, le *Neomixis tenella*

c- L'herpetofaune

Un bref inventaire a permis d'identifier 3 espèces d'amphibiens dont 2 Ranidae et un Rhacophoridae [<http://www.sofia.gov.mg>].

Par ailleurs, on y a recensé 20 espèces de reptiles dont :

- Sept (7) Gekkonidae,
- Trois (3) Scincidae,
- Un (1) Iguanidae,
- Un (1) Gerrhosauridae,
- Deux (2) Chamaeleonitidae,
- Un (1) Boidae,
- Cinq (5) Colubridae.

C- CADRE HUMAIN

Région SOFIA abrite en 2007, plus d'un million cinq cent mille habitants, répartis dans 7 Districts différents.

Dans la Région SOFIA, presque 80% de la population sont constituées de Tsimihety sauf dans la sous-préfecture d'Analalava où la majorité des habitants sont plutôt des pêcheurs Sakalava.

Et classent la Région au 6^{ème} rang en termes de population. La population présente une densité moyenne de 15.4 habitants par km². La plus forte concentration se trouve à Antsohihy avec 21.2 habitant par km² et la plus faible se trouve à Analalava 8.4 habitant par km². La région SOFIA est caractérisée par une population très jeune, car plus de 45% de la population ont moins de 15 ans, traduisant une réelle expansion démographique qui est due essentiellement à la forte fécondité que connaît la zone. La charge familiale est assez pesante : 7.2 personnes par ménage en moyenne. Enfin un déséquilibre spatial est observé entre l'Est et l'Ouest. [<http://www.sofia.gov.mg>]

D- TYPOLOGIE

Les paramètres physiques et agro-écologiques font état de deux sous-ensembles Régionaux :

- ✓ la zone des Hauts Plateaux du Nord,
- ✓ la zone basse du Nord-Ouest.

Quatre des sous-préfectures (Antsohihy, Port-Bergé, Analalava, Mampikony) appartiennent à la zone agro-écologique du Nord-Ouest, et trois (Mandritsara, Befandriana- Nord et Bealanana) constituent les Hauts-Plateaux du Nord.

La zone haute, à plus de 1.000 m d'altitude, constitue le Nord-Est et l'Est. Il s'agit d'une zone fortement dégradée, parcourue fréquemment par des feux de brousse.

Les hauts plateaux du pays de l'Androna correspondent à une zone de riziculture irriguée traditionnelle soutenue par l'élevage bovin. Les cultures sur brûlis et les cultures de rente sont très développées dans les sols ferralitiques lessivés.

La partie septentrionale (moitié nord d'Analalava) constitue une sous zone de production de cultures pérennes largement représentées par le café, le poivre et le cacao. La partie centrale (moitié Sud d'Analalava) et toute la sous préfecture d'Antsohihy est un secteur quasi-exclusif des cultures vivrières avec prédominance de la riziculture traditionnelle.

Le secteur sud, Sous-préfecture de Port-Bergé et de Mampikony, constitue le domaine des cultures industrielles sur "baiboho" avec association des cultures vivrières et maraîchères sur près de 65 % de la superficie de la zone. La zone basse ou "baiboho" inclut la partie Ouest et Nord-Ouest où se trouvent alternés plaines, collines et lambeaux de plateaux résiduels.

Les zones de production sont concentrées dans les dépressions (Ankaizina), lacs, "baiboho" et vallées (la Loza, la Sofia et surtout la Bemarivo). Les sols, enrichis par des apports fluviaux sont favorables aux cultures vivrières diversifiées (riz, manioc, maïs, bananiers, canne à sucre, oignons...) et industrielles (tabac, coton).

E- LES MENACES

L'espèce phare de cet habitat est le lémurien *Eulemur macaco flavifrons*, gravement menacé d'extinction et dont l'existence est connue surtout dans les forêts de la presqu'île de Sahamalaza.

On y trouve parmi eux le *Phaner furcifer*, Fork marked dwarf lemur qui est quasi-menacé, *Eulemur macaco flavifrons* ou Black lemur, gravement menacé d'extinction, l'*Hapalemur griseus occidentalis*

Pour les récifs coralliens, actuellement les holothuries sont menacées par une surexploitation importante. Les plongeurs locaux ont su identifier vingt (20) espèces d'*Holothurias* à l'aide de livres.

Une espèce est menacée, le ***Lophotibis cristata***, ou l'*Ibis huppé* de Madagascar .

En effet, dans les formations dégradées, ***Rattus rattus*** entre souvent en compétition avec les espèces endémiques, Tampoketsa Analamaintso.

Les forêts humides dégradées et/ou secondaires de Tampoketsa Analamaintso résulte de la dégradation des forêts denses humides sempervirentes de moyenne altitude. La réserve est enfin couverte de savanes, de steppes.

MATERIELS ET METHODES

II-1 MATERIELS

II-1-1 POSITION SYSTEMATIQUE

a- Classification classique

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Callitrichales
Famille	Hydrostachyaceae Engl. (1894)
Genre	<i>Hydrostacys</i>
Espèce	<i>Hydrostachys plumosa</i> A.Juss ex Tul.
Nom vernaculaire	<i>Rondra ; Tsilavondriana</i>

La famille des **HYDROSTACHYACEAE** est une famille de plantes dicotylédones.

En classification classique (1981), cette famille est placée parmi l'ordre des *Callitrichales* ou parfois parmi celui des *Scrophulariales*.

La classification phylogénétique situe cette famille dans l'ordre des *Cornales*



Planche 1a : *Hydrostachys plumosa*

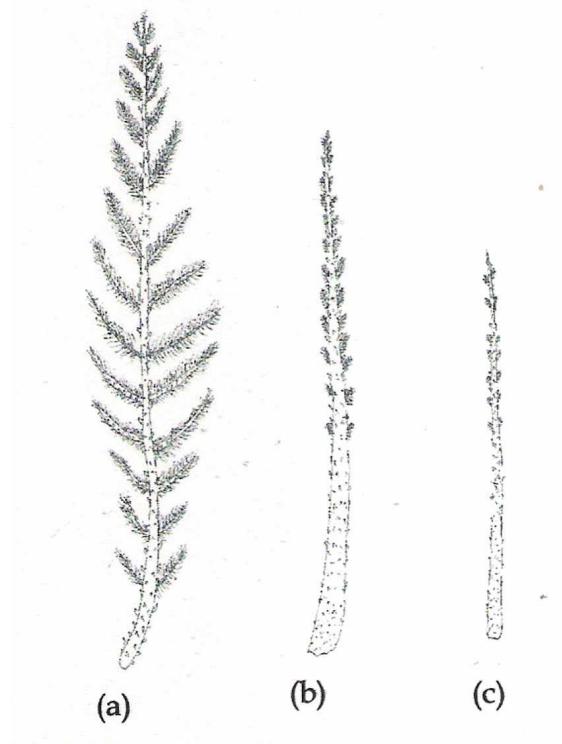


Planche 1b : Morphologie de l'espèce *Hydrostachys plumosa* (HYDROSTACHYACEAE) : (a). Une fronde adulte ; (b). Une jeune fronde et (c). Une plantule (x3).

c- Caractéristiques botaniques d'*Hydrostachys plumosa*

La famille des HYDROSTACHYACEAE, comprend un seul genre, l'*Hydrostachys*.

Les systématiciens qui ont étudié cette famille [Ad. DE JESSIEU, TULASNE, ENGLER, REIMERS, HAUMAN, PERRIER DE LA BATHIE et réviser par COLETTE CUSSET, 1973 ; WARNING ,1891] ont établi les taxons d'après la feuille (degré de ramification, forme et taille des émergences).

Elle comprend une vingtaine d'espèces du genre *Hydrostachys* dont 18 endémiques de Madagascar ; les autres sont d'Afrique tropicale [H.PERRIER DE LA BÂTHIE, 1952].

II-1-2 DESCRIPTION

Ce sont des plantes herbacées aquatiques, annuelles ou pérennes, tubéreuses, aux feuilles submergées, des régions tempérées à tropicales, originaires d'Afrique du Sud et de Madagascar.

Cette espèce est à peine distincte par les pétioles plus ou moins couverts d'émergences jusqu'à la base et par les rachis secondaires portant des petites pinnules II à 2-5 émergences étroites et filiformes, la feuille paraissant néanmoins simplement pinnée et les pinnules restant cylindriques dans leur contour. Ces préfeuilles sont largement ovales (10-12 x 8-10 mm), sessiles, plus ou moins obtuses ou anguleuses au sommet, nues en dessous avec des nervures rayonnantes et bifurquées, couvertes sur la face supérieure d'émergences apprimées, linéaires au milieu, de plus en plus longues et larges en approchant des bords, qui portent des émergences plus grandes (2 x 1,5 mm). Rare, mais connu de quelque Région.

II-1-3 COLLECTE ET IDENTIFICATION DES PLANTES MEDICINALES

Comme le but de l'étude est de valoriser les plantes médicinales aquatiques de la Région SOFIA, une collecte a été effectuée dans des districts sélectionnés dans une zone d'étude définie. Les plantes mentionnées comme ayant des activités thérapeutiques ciblées lors des enquêtes ont été particulièrement récoltées dans leur milieu naturel.

- ✓ Prendre une plante entière ou seulement le morceau représentatif, pour chaque espèce au moins 2 individus.
- ✓ Placer dans le cahier de récolte avec l'étiquette.
- ✓ Utiliser les feuilles de journaux simplement préchés sous un carton et serrer les tous avec des sangles.
- ✓ Changer tous les journaux après 2 ou 3 jours jusqu'au séchage complet.
- ✓ Une fois sécher entrer dans l'herbier.
- ✓ Les plantes ont été notées par leur nom vernaculaire local.
- ✓ L'identification de leur nom scientifique, de leur famille botanique et de leur espèce a été réalisée au laboratoire de Biologie végétale des Facultés des Sciences de Mahajanga (CURARE) et au Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza.
- ✓ Ces plantes ont été stockées au sein du Laboratoire de Biodiversité Végétale de la Faculté des Sciences de Mahajanga (CURARE).

II-1-4 CHOIX DE L'ESPECE A ETUDIER

La sélection des espèces à étudier a été faite par une équipe pluridisciplinaire (Ecologues, pharmacologues, botanistes, phytochimistes). Le choix a été fixé sur une liste d'espèces de plantes médicinales établie à partir des enquêtes. Ainsi, les critères suivants ont été pris en considération :

- ✓ la fréquence de l'utilisation de chaque espèce afin de connaître si une espèce donnée est très utilisée ou non par la population locale pour traiter des maladies dans leur foyer ou dans leur village.
- ✓ l'endémicité de l'espèce sélectionnée. Ce critère est très important dans le cadre de la conservation de plante.
- ✓ l'habitat de la plante.

II-2 METHODES

préalables de la Région SOFIA ont été effectuées sur internet et sur l'Atlas de Madagascar (Documentation au laboratoire de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences Mahajanga (CURARE).

II-2-2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La documentation sur les plantes médicinales aquatiques de la région SOFIA a été effectuée sur internet, sur intranet (Bibliothèque universitaire d'Antananarivo), à la bibliothèque du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza (Antananarivo), et à l'Institut Malgache de Recherche Appliquées (IMRA, Antananarivo). Ces études ont été faites pour avoir des informations sur ces plantes et pour savoir si elles n'ont pas été déjà étudiées par d'autres auteurs.

II-2-3- ETUDES ETHNOBOTANIQUES

A- CHOIX ET LOCALISATION DES LIEUX D'ETUDE

Les critères de choix des villages à enquêter sont:

- ✓ La proximité par rapport aux zones d'études,
- ✓ La densité de la population,
- ✓ L'appartenance des villages à une même commune.
- ✓ Aucune étude éthnopharmacologique n'a été faite dans les villages.

B- ENQUETES ETHNOBOTANIQUES

Les enquêtes ont été axées sur les maladies les plus fréquemment rencontrées dans la Région SOFIA et sur les plantes médicinales utilisées pour chaque type de maladie. Elles ont été effectuées sous forme de questions fermées, semi-ouverte ou ouverte (MARTIN, 1995). Les questionnaires ont été préalablement présentés sous forme de tableau et ont ensuite été adaptés selon les circonstances.

C- CATEGORIES D'INFORMATEURS

L'enquête a été réalisée en Mai 2009 et a duré 12 jours :

- ✓ 5 jours à Mandritsara,
- ✓ 5 jours à Antsohihy,
- ✓ 2 jours à Port-Bergé

Les critères des informateurs sont le sexe, le groupe ethnique et la profession.

Toutes les personnes enquêtées appartiennent au groupe ethnique "Tsimihety" (Tableau I).

Tableau I : Catégories et nombres des personnes enquêtées

Critères de catégorisation	Catégories	Nombre des personnes interviewées à Mandritsara	Nombre des personnes interviewées à Antsohihy	Nombre des personnes interviewées à Port-bergé
Sexe	Femme Homme	8 9	8 4	3 3
Groupe ethnique	Tsimihety			
Profession	Tradipraticiens Mpimasy Matrones Herboristes Paysans Marchands Responsables administratifs Enseignants. Citoyens			

Pour cela, différentes catégories d'informateurs ont été auditionnées :

- ✓ Tradipraticiens,
- ✓ "Mpimasy"
- ✓ Matrones,
- ✓ Herboristes
- ✓ Paysans,
- ✓ Marchands des plantes médicinales,
- ✓ Administrateurs,
- ✓ Enseignants.
- ✓ Citoyens

II-2-4 ETUDES DES PLANTES MEDICINALES

II-2-4-1 PREPARATION DES EXTRAITS BRUTS VEGETAUX

Les plantes (feuilles, tiges, écorces, racines) seront identifiées au Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza (Antananarivo). Elles ont été codées, séchées, broyées, conditionnées et répertoriées dans la banque. Des extraits bruts ont ensuite été préparés à partir de ces plantes et les résidus secs ont été codés, pesés et conservés. Ils ont servi à la réalisation des différents tests phytochimiques et pharmacologiques.

II-2-4-2 PREPARATION DES EXTRAITS POUR LE CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

- ✓ Placer 50 g de plante séchée, broyée dans un ballon rodé de 500 ml.
- ✓ Rajouter 200 ml de méthanol 80%. Adapter au réfrigérant.
- ✓ Porter le ballon dans un bain-marie bouillant pendant 1heure.
- ✓ Refroidir sous courant d'eau le contenu du ballon et filtrer sur Büchner.
- ✓ Laver le ballon avec 50 ml de méthanol 80% et réunir les solutions alcooliques.
- ✓ Mesurer le volume de la solution et calculer l'équivalent de plante par ml d'extrait alcoolique cette solution a servi à la réalisation des divers tests phytochimiques.

II-2-4-3 PREPARATION DES EXTRAITS POUR LE TEST DE CYTOTOXICITE

- ✓ 10 g de plante séchée et broyée ont été macérée sous agitation dans de l'hexane (Hex), du dichlorométhane (DCM), de l'acétate d'éthyle

(AcEt) et du méthanol (MeOH) durant toute la nuit à température ambiante.

- ✓ Après filtration, le solvant a été éliminé par évaporation sous vide au moyen d'un rotavapor relié à un réfrigérant.
- ✓ Le résidu végétal est récupéré dans un tube à hémolyse en verre, séché à 45 °C dans un "Speed-vac concentrator" (S AVANT), pesé, codé et gardé à 4 °C (réfrigérateur).

A- ETUDES CHIMIQUES

1- CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Le criblage phytochimique constitue la première étape de l'étude chimique d'une plante. Il s'agit de faire l'inventaire des diverses grandes classes des composés contenus dans la plante telles que : les alcaloïdes, les flavonoïdes et les leucoanthocyanes, les tanins et les polyphénols, les quinones, les stéroïdes et terpénoïdes, les saponosides et les polysaccharides.

1.1- PREPARATION DES REACTIFS

a- Réactif de Dragendorff

- ✓ Solution A : 1,7 g de sous-nitrate de bismuth, 20g d'acide tartrique, à dissoudre dans 30 ml d'eau.
- ✓ Solution B : 16 g d'iodure de potassium à dissoudre dans 40 ml d'eau.
- ✓ Révélateur : Mélanger extemporanément 2,5 ml de la solution A et 2,5 ml de la solution B. Ajouter 10 g d'acide tartrique dissout dans 50 ml d'eau.

b. Réactif de Wagner

Dissoudre 2 g d'iodure de potassium et 1,27 g d'iode dans 100 ml d'eau.

c. Réactif de Meyer

Dissoudre 1,35 g de chlorure mercurique (II) dans 94ml d'eau. Rajouter 5g d'iodure de potassium. Après dissolution complète, ramener à 100 ml le volume total avec de l'eau.

d. Gélatine

Mettre 1g de gélatine en suspension dans 100 ml d'eau.

e. Chlorure de sodium à 10%

Dissoudre 10 g de chlorure de sodium dans 100 ml d'eau.

f. Gélatine salée

Mélanger un volume de la solution de gélatine à un volume égal de la solution de chlorure de sodium 10%.

g. Acide chlorhydrique à 5%

Verser 95 ml d'eau distillée dans une éprouvette et compléter à 100 ml avec de l'acide chlorhydrique 32%.

h. Réactif de KEDDE

- ✓ Dissoudre 2g d'acide 3,5-dinitrobenzoïque dans 100 ml de méthanol (solution A).
- ✓ Dissoudre 5,6 g de potasse dans 100 ml d'eau (solution B).

Au moment de l'emploi, mélanger à volume égal les solutions A et B.

i. Réactif de KELLER-KILLIANI

- ✓ Dissoudre 10g de chlorure ferrique dans 100 ml d'eau
- ✓ Au moment de l'emploi, mélanger 0,3 ml de la solution de chlorure ferrique dans 50 ml d'acide acétique glacial.
- ✓ Prélever 3 ml du mélange pour le test KELLER.

j. Chlorure ferrique à 10% dans le méthanol

Dissoudre 1g de chlorure ferrique dans 10ml de méthanol en agitant et en chauffant au bain-marie jusqu'à dissolution complète.

1.2- CRIBLAGE DES ALCALOÏDES

Le criblage est effectué en 2 étapes : macération et test préliminaire.

1.2.1- Macération chlorhydrique

- ✓ Prendre environ 5 g de poudre de plante. Faire macérer dans HCl 12% à 2 N pendant 15 mn.
- ✓ Filtrer éventuellement sur coton.
- ✓ Repartir le filtrat dans 4 tubes à essais.
- ✓ Ajouter un peu de HCl si nécessaire pour avoir une solution lipide et claire.
- Tube 1 : Témoin
- Tube 2 : Ajouter 5 gouttes de Réactif de Wagner
- Tube 3 : Ajouter 5 gouttes de Réactif de Mayer
- Tube 4 : Ajouter 5 gouttes de Réactif de Dragendorf.
- ✓ Observer l'apparition de précipité.

1.2.2- Test préliminaire

A partir de l'extrait hydroalcoolique brut végétal précédemment préparé,

- ✓ Prendre un volume équivalent à 25 g de plante (257.5 ml) et placer dans un cristallisoir.
- ✓ Evaporer l'alcool jusqu'à l'obtention d'un résidu de consistance sirupeuse.
- ✓ Ajouter 10 ml de HCl 2N et agiter à l'aide d'une baguette de verre tout en chauffant dans un bain-marie bouillant pendant 3 à 5 mn.
- ✓ Refroidir le mélange jusqu'à température ambiante, puis rajouter 0,5g de NaCl.
- ✓ Agiter, filtrer et laver le précipité avec un volume suffisant de HCl 2N.
- ✓ Repartir le filtrat dans 4 tubes et refaire les tests comme précédemment.

1.3- CRIBLAGE DES FLAVONOÏDES ET DES LEUCANTHOCYANES

- ✓ Evaporer la solution hydroalcoolique d'extrait végétal équivalente à 3 g de plante (30.9 ml) dans un cristallisoir. Refroidir et éliminer les pigments par un épuisement à l'éther de pétrole.

- ✓ Dissoudre le résidu solide obtenu dans de l'éthanol puis filtrer.
- ✓ Répartir le filtrat dans 5 tubes à essai ;
- Tube1 : Témoin
- Tube2 : Test de WILSTATER.
 - ✓ Observer la variation de la coloration.
 - ✓ Ajouter 0,5ml de HCl concentré et quelques tournures de Magnésium.
 - ✓ Laisser agir 10 min.
- Tube 3 : Test de WILSTATER modifié
 - ✓ Rajouter 0,5 ml de HCl concentré et quelques tournures de Magnésium.
 - ✓ Après dissolution du Mg, rajouter 1ml d'eau et 1ml d'alcool isoamilique.
 - ✓ Laisser agir 10 mn.
 - ✓ Observer la variation de la coloration de la phase supérieure.
- Tube 4 : Test de BATSMITH
 - ✓ Rajouter 0,5 ml de HCl concentré.
 - ✓ Chauffer pendant 30mn au bain-marie.
 - ✓ Laisser refroidir à température ambiante.
 - ✓ Observer la coloration.
- Tube 5 : Test de BATSMITH modifié
 - ✓ Rajouter 0,5 ml de HCl concentré à froid.
 - ✓ Observer la coloration.

1.4- CRIBLAGE DES TANINS ET DES POLYPHENOLS

- ✓ Evaporer la solution équivalente à 5g de plantes (51.5 ml) dans un cristallisoir.
- ✓ Rajouter 15 ml d'eau distillée.
- ✓ Chauffer sous agitation.
- ✓ Ajouter 4 gouttes de solution de NaCl 10%, puis filtrer.
- ✓ Répartir le filtrat dans 4 tubes à essais
- Tube 1: Témoin
- Tube 2 :
 - ✓ Rajouter 4 à 5 gouttes de gélatine à 1%.
 - ✓ Observer l'apparition de précipité.
- Tube 3 :

- ✓ Rajouter 4 à 5 gouttes de gélatine salée.
- ✓ Observer l'apparition de précipité.
- Tube 4 :
 - ✓ Rajouter 4 à 5 gouttes de FeCl_3 10% dans MeOH.
 - ✓ Observer la variation de la coloration.

1.5- CRIBLAGE DES QUINONES

- ✓ Evaporer la solution alcoolique équivalente à 5 g de plante 51.5 ml dans un cristallisoir.
- ✓ Dissoudre le résidu dans 15 ml d'eau distillée, puis filtrer.
- ✓ Extraire le filtrat avec un mélange d'éther-chloroforme 3/1 (V/V), ou hexane-chloroforme ou du benzène (petite ampoule à décanter).
- ✓ Rajouter 5 ml de NH_4OH 25% puis agiter.
- ✓ Observer le changement de la coloration de la phase alcaline (phase inférieure).

1.6- CRIBLAGE DES STEROIDES ET DES TERPENOIDES

- ✓ Les stéroïdes diffèrent des triterpénoides par des tests de coloration et de fluorescence.
- ✓ Evaporer complètement la solution hydroalcoolique équivalente à 5g de plante (51.5 ml) dans un cristallisoir au bain-marie.
- ✓ Laisser refroidir.
- ✓ Rajouter 5 ml d'éther de pétrole. Agiter et filtrer.
- ✓ Répéter l'opération jusqu'à l'élimination des pigments.
- ✓ Rajouter 10 ml de chloroforme puis agiter pendant 5 à 10mn.
- ✓ Décanter et sécher la solution avec Na_2SO_4 anhydre, puis filtrer.
- ✓ Répartir le filtrat dans 6 tubes à essais propres et secs.
- Tube 1 : Témoin
- Tube 2 : Rajouter un peu de solution saturée d'antimoine.
 - ✓ Observer la variation éventuelle de la coloration du milieu.
- Tube 3 : Test de LIEBERMANN BURCHARD
 - ✓ Rajouter successivement 3 à 4 gouttes d'anhydride acétique puis 3 à 4 gouttes de H_2SO_4 concentré.
 - ✓ Observer la variation éventuelle de la coloration.

- Tube 4 : Test de SALKOWSKI
 - ✓ Incliner le tube à 45°
 - ✓ Ajouter 1 ml de H_2SO_4 concentré.
 - ✓ Observer la coloration éventuelle de l'anneau de séparation.
- Tube 5 : Test de BADJET KEDDE
 - ✓ Rajouter quelques grains d'acide picrique.
 - ✓ Observer la coloration éventuelle de séparation.
- Tube 6 : Test de KELLER-KILLIANI
 - ✓ Rajouter successivement quelques gouttes de $FeCl_3$ 10%, puis quelques gouttes d'acide acétique glacial.
 - ✓ Observer la coloration éventuelle de l'anneau de séparation.

1.7- CRIBLAGE DES SAPONINES

- ✓ Mettre 1g de poudre de plante dans un tube à essai.
- ✓ Rajouter 10 ml d'eau distillée et agiter vigoureusement pendant 30 s.
- ✓ Placer le tube verticalement pendant 30 mn à température ambiante.
- ✓ Observer l'apparition éventuelle d'une mousse sur la partie supérieure.
- ✓ Noter l'abaissement de la hauteur de la mousse

1.8- CRIBLAGE DES POLYSACCHARIDES

- ✓ Préparer une décoction à partir de 5 g de poudre de plante dans 60 ml d'eau.
- ✓ Faire bouillir à 200° C ; laisser refroidir à température ambiante puis filtrer.
- ✓ Rajouter au filtrat 3 volumes d'alcool éthylique à 90°C
- ✓ Observer la formation éventuelle de précipité

1.9- TEST D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Le test consiste à détecter la formation de radicaux libres en présence d'un réactif spécifique, le 1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). Le résultat est positif s'il le réactif vire de la coloration mauve en jaune.

Cette technique peut être utilisée soit :

- (1) comme système de révélation sur des plaques chromatographiques ;

(2) comme réaction chimique d'identification des radicaux libres dans des solutions de concentrations bien déterminées.

Dans notre cas, c'est la première méthode qui a été adoptée.

Pour cela :

- ✓ Déposer en spot l'extrait sur une plaque CCM (Chromatographie sur Couche Mince).
- ✓ Développer la plaque dans une cuve chromatographique en utilisant un système de solvant adéquat.
- ✓ Préparer le révélateur (concentration 2mg/mL de DPPH dans le MeOH)
- ✓ Révéler la plaque.
- ✓ Observer immédiatement les changements de coloration des taches de migration.

B- ETUDES PHARMACOLOGIQUES

1- ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIPALUDIQUE

Le paludisme (palus= marais) ou malaria (mauvais air) est un érythrocytosepathie dû à un hématozoaire du genre *Plasmodium* [Manuila L., Manuila A., Lewalle P., Nicoulin M., 2001].

Le paludisme est causé par la rencontre obligatoire de trois êtres vivants : le *Plasmodium* sp agent pathogène, l'anophèle femelle, agent vecteur et l'homme, hôte réservoir infecté et infectant [(ReMeD). ,2009].

Les *Plasmodium* sont des parasites des hématies. Les 4 espèces plasmodiales parasites de l'homme sont : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*. [Rogier C., Parzy D., Spiegel A. in : Saissy J.M. 2001].

Selon les estimations de l'O.M.S [WHO., 2005], cette maladie parasitaire tue un enfant toutes les trente secondes en Afrique, et est responsable d'un à trois millions de décès par an dans le monde. Le nombre de personnes contaminées est estimé entre 300 à 600 millions par an, dont la grande majorité se trouve en Afrique [Rinaldi A., 2004].

Cette maladie touche surtout les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes au cours de leurs premiers mois de grossesse [Antonio, Almeida, Atul Mehta, 2001].

L'augmentation de la résistance de *P. falciparum* à la plupart des antipaludiques actuellement disponibles sur le marché sont d'une augmentation dramatique de la mortalité par le paludisme [Trape J.F. in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001].

A l'heure actuelle, près de 100 pays ou territoires sont considérés comme impaludés, dont près de la moitié en Afrique, au Sud de Sahara. La plupart étant due au *P. falciparum* [Rogier C., Fusaït T., Pradines B. in : SAISSY J.M., Arnette 2001]

Deux hôtes successifs sont nécessaires à l'accomplissement du cycle :

- ✓ un hôte intermédiaire (l'homme) où il se trouve sous une forme haploïde et se multiplie de manière asexuée ou schizogonique,
- ✓ un hôte définitif (l'anophèle femelle) où s'effectue la multiplication sexuée ou sporogonique. [Mazier D. in : Danis M., Mouchet J. 1991] .

Il est à noter que durant notre recherche, *Plasmodium yoelii* a été utilisée dans le laboratoire pour infecter des souris, comme un modèle de l'homme contre le paludisme, en particulier à l'égard de la réponse immunitaire. Cette espèce a été décrite en 1968 par Landau, Michel et Adam. Elle se rencontre en Afrique. Deux sous-espèces sont reconnues : *Plasmodium yoelii nigeriensis* et *Plasmodium yoelii yoelii*.

Il est avantageux d'avoir un tout-modèle animal de la malaria, car il est souvent difficile de savoir quels sont les facteurs à l'étude *in vitro*, en particulier dans un système complexe comme le système immunitaire.

1.1- TEST IN VITRO ANTIPALUDIQUE CHEZ LA SOURIS

La phase érythrocytaire du paludisme est provoquée en injectant chez la souris 10^7 hématies parasitées. Les souris ainsi infectées sont traitées pendant trois jours successifs.

La parasitémie des souris infectées a ensuite été évaluée à la 4^è journée par rapport à un groupe de témoins de souris non traitées.

1.2- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1.2.1- Préparation des souris donneuses

- ✓ Sortir les hématies parasitées de la cryoconservation (au moins avec une parasitémie de 30%).

- ✓ Décongeler rapidement à 37°C.
- ✓ Centrifuger à 1500 tours/minute pendant 3 à 4 minutes.
- ✓ Récupérer le culot (parasites) et diluer de moitié avec de la solution physiologique (NaCl 0,9 %) à 37° C puis homogénéisé. Il faut 1 ml pour infecter 4 souris.
- ✓ Injecter au niveau de la veine caudale 0,25 ml de solution contenant les hématies parasitées.
- ✓ Suivre quotidiennement l'évolution de la parasitémie (proportion des hématies parasitées : 10^7 parasite/souris) jusqu'à obtenir des parasites pour réaliser le test proprement dit (en fonction du nombre des souris à infester pour le test).

1.2.2- Infestation des souris.

- ✓ Préparer 2 lots de 4 souris au moins dont un lot témoin absolu non traité et de lot traité avec différentes doses d'extrait végétal à tester.
- ✓ A l'aide de pipettes Pasteur stériles et humectées avec de l'héparine, prélever le sang des souris donneuses au niveau de la veine du sinus retro-orbitale (environ 1 ml de sang/souris).
- ✓ Collecter le sang des souris dans 1 tube à essai contenant quelques gouttes d'héparine et maintenu dans 1 bain-marie à 37 °C.
- ✓ Mélanger et évaluer la parasitémie du mélange (hématies parasitées).
- ✓ En fonction du nombre de souris à impaluder et de la parasitémie, diluer le sang avec du NaCl 0,9 % de façon à ce que chaque souris reçoive 10^7 hématies parasitées sachant que le volume à injecter est de 0,25 ml/souris, et que la formule utilisée est $V = (10^4 \times N) / P$ où V, le volume de sang, N, le nombre de souris à infecter et P, la parasitémie des souris donneuses [Peters W. et col, 1975].

1.2.3- Traitement des souris infectées.

- ✓ Les souris ont été de préférences infectées par voie intraveineuse (iv) et le traitement par l'extrait végétal a été effectué tout de suite.
- ✓ Injecter par gavage 0.5 ml d'une dose de 500 mg d'extrait par kg de souris, une fois par jour pendant 3 jours.

- ✓ Au 4^è jour, faire un frottis mince sur une lame bien propre à partir du sang pressé au niveau de la veine caudale de la souris.
- ✓ Colorer le frottis au Diff quick : fixation du frottis au MeOH suivie de coloration avec de l'éosine puis avec du bleu de méthylène.
- ✓ Laver à l'eau de robinet puis sécher à l'étuve à 37°C.
- ✓ Observer au microscope puis évaluer la parasitémie de chaque souris sur au moins 2000 hématies.
- ✓ Calculer le pourcentage d'inhibition de la parasitémie provoquée par la dose d'extrait végétal utilisé et par rapport au lot de souris témoins.

Il est à noter que la mort des souris survient le plus souvent à une parasitémie de plus de 50% [Peters W. et col, 1975]

2- ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIHISTAMINIQUE

L'histamine ou β -imidazole éthylamine se forme par décarboxylation de l'histidine, acide aminé normal de l'alimentation (histamine exogène) et des tissus (histamine endogène) sous l'action de l'histidine décarboxylase. Présente dans de nombreux tissus (mastocytes, intestin, estomac, foie, peau, plaquettes sanguines, leucocytes basophiles), elle est tenue pour responsable de certains phénomènes pathologiques : choc, anaphylaxie, allergie.

Une surcharge en histamine provoque trois phénomènes essentiels : contraction des fibres lisses, dilatation des capillaires avec augmentation de leur perméabilité et accroissement de la sécrétion gastrique. Normalement, l'histamine subit la désamination oxydative ou l'acétylation et s'élimine dans l'urine.

Etant donné le rôle de l'histamine en pathologie, on a cherché à neutraliser par divers moyens cette substance dans l'organisme. Les antihistaminiques sont des antagonistes compétitifs de l'histamine à l'égard des récepteurs tissulaires ; la plupart présentent une analogie structurale avec l'histamine et possèdent, à des degrés divers, des actions secondaires : hypnotiques, anesthésiques locaux, inhibiteurs du recaptage de la noradrénaline. Ils s'opposent à la plupart des actions de l'histamine telles que l'hypotension, l'effet contracturant sur les fibres lisses, les phénomènes allergiques et anaphylactiques.

L'objectif de notre étude est de mettre en évidence l'activité relaxante de l'*Hydrostachys plumosa* sur la trachée isolée de cobaye préalablement stimulée par l'histamine, un des agents spasmogènes lors de la crise d'asthme.

2.1- TEST ANTIHISTAMINIQUE IN VITRO CHEZ LE COBAYE

2.1.1- Préparation de milieu de survie de Krebs

Pour 1 L d'eau distillée :

✓	NaCl : 6,9 g.
✓	Glucose : 2 g.
✓	NaHCO ₃ : 2,2 g.
✓	KCl : 0,4 g
✓	CaCl ₂ : 0,28 g.
✓	MgSO ₄ : 0,14 g.
✓	KH ₂ PO ₄ : 0,14 g.

2.1.2- Prélèvement, préparation et montage d'organe : Trachée de cobaye

Le cobaye, de sexe mâle ou femelle, de poids moyen de 300 ± 50 g, est sacrifié par dislocation cervicale. Après ouverture longitudinale au niveau de la gorge par incision cutanée, la trachée est dégagée. L'xsanguination est faite par coupure de deux artères carotidiennes. La trachée est prélevée de l'ouverture buccale jusqu'à la première bifurcation de la bronche et plongée dans la boîte de Pétri contenant de la solution de Krebs. Débarrassé des tissus conjonctifs et des tissus adipeux, l'organe est découpé en hélice de 2 à 3 cm de long. La trachée est ensuite montée dans une cuve à organes contenant la solution de survie aérée avec du carbogène (95% de O₂ et 5% de CO₂) et maintenue à 37°C à l'aide du bain thermostaté, et soumis à une tension isométrique de 2 g. Pendant une période d'équilibration de 90 min, la préparation est lavée toutes les 30 min. A la fin de cette période, on procède à l'étape de sensibilisation par stimulation de la trachée par injection d'histamine. La durée de cette sensibilisation est de 15 min. Puis les organes sont lavés au moins trois fois espacés de 5 min.

2.1.3- Précontraction de la trachée par l'histamine et Test de relaxation

30 min après le dernier rinçage, la trachée est contractée avec de l'histamine à 10^{-6} M puis à 10^{-5} M. Au plateau de contraction, la relaxation est étudiée par ajout de 62.5, 125, 250, 500 et 1000 µg/ml d'extrait végétal à tester dans un volume total de 20 ml (cuve). Les réponses pharmacologiques ainsi obtenues sont en pourcentages de relaxation. La valeur de CE₅₀ de relaxation (concentration de

l'extrait qui relâche à 50% la trachée isolée précontractée par l'histamine) est enfin déterminée à partir de la courbe effet-concentration utilisant la méthode de régression linéaire.

C- ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE : TEST DE CYTOTOXICITE

1. PREPARATION DES SOLUTIONS D'EXTRAITS VEGETAUX

Les extraits bruts végétaux sont de préférence dissous dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 20 mg/ml et gardés à 4°C. Il s'agit de solutions stocks.

Pour réaliser les tests de cytotoxicité, des dilutions à des concentrations désirées sont extemporanément effectuées dans du RPMI.

1.1- CULTURE CELLULAIRE

1.1.1- LIGNEE CELLULAIRE

La lignée leucémique lymphoblastique P388 sensible à la doxorubicine de souris a été utilisée comme modèle d'étude de l'activité cytotoxique des extraits végétaux.

1.1.2. CULTURE DES CELLULES

A- Conservation des cellules

Les cellules P388 sont conservées dans de l'azote liquide, dans des gélules contenant 90% de Sérum de Bovin Fœtal (FBS) et 10% de DMSO.

b- le sérum de bovin fœtal : décomplémentation

Le sérum de bovin fœtal (SBF) utilisé pour la culture cellulaire doit être préalablement décomplété. Pour cela, sortir le sérum de la congélation (-20 °C) et le décongeler dans un bain Marie à 37° C. Après décongélation, placer le PBS dans une étuve à 50°C pendant 60 min. Sortir le SBF ainsi décomplémenté et l'aliquoter dans des flacons stériles sous la hotte.

Le flacon utilisé est à garder à 4°C [réfrigérateur], les autres sont à conserver à -20°C jusqu'à leur utilisation.

C- Le β -mercaptoproéthanol

Le β -mercaptoproéthanol est un réducteur. Sa densité est de 1.1143.

- ✓ Préparer une solution stérile molaire avec de l'eau désionisée stérile [filtration sur membrane 0.22 μm].
- ✓ Faire une dilution pour avoir une solution à 1 mM.
- ✓ Garder la solution molaire à -20°C et la solution à utiliser à 4°C.

d- Le milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour les cellules P388 est un milieu RPMI 1640 [Roswell Park Medium Institut].

Pour 1L de milieu de culture à pH 7,4 :

- ✓ Dissoudre le contenu d'une boite de poudre de RPMI (15,89 g) dans 800 ml d'eau désionisée. Rajouter 1g de glucose et 2,1 g de NaHCO₃ et laisser dissoudre sous agitation magnétique. Compléter ensuite le volume d'eau à 1L.
- ✓ Stériliser par filtration le milieu ainsi préparé à l'aide d'un Kit filtre de 0.22 μm . Pour cela, ouvrir le Kit filtre sous la hotte et le placer sur un flacon stérile de 1000 ml. Verser le milieu dans le réservoir du Kit et placer le couvercle. Brancher alors la pompe à vide et filtrer.
- ✓ A la fin de la filtration, enlever sous la hotte le Kit filtre et fermer (bouchon stérile) le flacon.
- ✓ Prélever l'équivalent de volume d'antibiotiques à rajouter et garder dans un tube à fond conique. Dans notre cas, on prélève 10 ml de milieu RPMI et rajoute 10 ml d'une solution de pénicilline (10000 UI/ ml) et de streptomycine (10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) soit 1% de solution d'antibiotiques.
- ✓ Mélanger et aliquoter dans des pots stériles en plastique de 200 ml.
- ✓ Le milieu de culture utilisé pour les cellules P388 est un milieu RPMI 1640. C'est un milieu incomplet. Le milieu de culture RPMI complet est à préparer en rajoutant ex tempore à :

 - 10% de SBF,
 - 1% de β -mercaptoproéthanol à 1 mM (concentration finale 10 μM),
 - éventuellement 1% de L-glutamine à 200 mM (concentration finale 2 mM) et de 1% de NAEAA (acides aminés non essentiels).

E- Mise en culture des cellules P388

Les cellules P388 sont non adhérentes. Elles sont cultivées en suspension dans des boites T25 (Nunclon-Gibco) contenant 10ml de milieu de culture RPMI complet et un inoculum de cellule P388.

Les cellules sont maintenues dans un incubateur Heraeus sous une atmosphère humide, à 37° C et enrichie en 5% de CO₂. La boite de culture est placée en position allongée avec bouchon légèrement dévissé.

Lorsque les cellules poussent, le milieu de culture qui initialement était de couleur orange, devient plus visqueux et vire au jaune indiquant une variation (diminution) du pH qui devient acide. En ce moment là, il faudra procéder au renouvellement du milieu de culture.

Lorsque les cellules arrivent en phase exponentielle de croissance (au bout de 72 H environ, d'incubation), elles sont récupérées dans des tubes à fond conique (FALCON) et centrifugées à 1200 tours/minute, à 4° C pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans un volume adéquat de RPMI 1640.

F- Numération cellulaire : Principe de comptage

Les cellules vivantes sont comptées à l'aide d'une lame de Thoma en utilisant du Bleu de Trypan. Dans ces conditions, les cellules vivantes sont brillantes ; celles qui sont mortes incorporent du bleu de Trypan et par conséquent, colorées en bleues.

Pour cela :

- ✓ A l'aide d'une pipette Pasteur stérile munie d'une poire, homogénéiser comme la suspension cellulaire.
- ✓ Prélever et transvaser dans un tube à hémolyse l'équivalent de 100 µl de cette suspension cellulaire et rajouter 100 µl de Bleu de Trypan. Vortexer.
- ✓ Prendre une Cellule de comptage de Thoma munie d'une lamelle et faire couler 10 µl de suspension cellulaire entre la lame et la lamelle.
- ✓ Observer les cellules au microscope à grossissement 10X.

- ✓ Compter les cellules vivantes délimitées par un champ. Compter également celles qui sont sur les bords du même champ. Faire la numération sur deux champs et considérer la moyenne.

Soit N , le nombre de cellules/champ. Le volume d'un champ est de 10^{-4} ml. Compte tenu de la dilution $1/2$ (suspension cellulaire/bleu de Trypan), le nombre rectifié de cellules est par conséquent de $2N/\text{champ}$, soit $2N/10^{-4}$ ml. D'où la concentration cellulaire de $2N \cdot 10^4$ cellules/ml. Connaissant le volume total de la suspension cellulaire, on peut en déduire le nombre total de cellules.

1.2- EVALUATION DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE : Détermination de CI_{50}

Le test de cytotoxicité consiste à mettre les cellules P388 en culture en présence des extraits bruts végétaux et d'évaluer par la suite, le pourcentage de survie cellulaire ou d'inhibition de la prolifération cellulaire.

Les tests sont effectués dans des microplaques à 96 puits à fond conique. Chaque concentration d'extrait végétal est testée sur 4 puits et au moins en triplet ($n \geq 3$) de manière indépendante afin d'assurer la reproductibilité de l'expérience.

Le volume final de chaque puit est fixé à 200 μl ; 100 μl réservés pour l'extrait à tester et 100 μl pour la suspension cellulaire. Pour cela, $2 \cdot 10^4$ cellules sont incubées à 37°C en présence de chacune des concentrations d'extrait végétal, sous une atmosphère composée de 5% de CO_2 pendant 72 H. Les solutions stocks d'extraits végétaux à tester sont extemporanément diluées en milieu stérile dans le milieu de culture utilisé.

Dans les puits "témoins" (contrôle), la solution d'extrait végétal est remplacée par du milieu de culture contenant la même concentration en DMSO.

Pour cela, les cellules sont incubées dans les mêmes conditions en présence (Essais) ou en absence (contrôle) des différentes concentrations croissantes (de 1 à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en extraits bruts végétaux.

Pour tous les tests effectués, la concentration finale en DMSO a été fixée à 0,5%. Dans ce cas, des études préliminaires nous ont permis de démontrer que le DMSO n'avait aucun effet inhibiteur sur la prolifération des cellules P388.

De plus, la camptothécine (CPT, 5 μM) dont l'action empoisonnante de la topoisomérase I provoque l'induction de l'apoptose [Ning Zhou and Zhou Wang, 1997] a servi de contrôle positif.

1.2.1- Evaluation de la viabilité cellulaire.

L'inhibition de la prolifération des cellules P388 a été suivie par le test classique d'incorporation du Rouge neutre à 540 nm. Dans cette condition, seules les cellules vivantes incorporent du Rouge Neutre et absorbent à 540 nm. Par conséquent, la DO mesurée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes contenues dans chaque puits. [Winckler J, 1974. Borenfreund E, Puener JA. ,1985. Teepe RGC, Koebrugge EJ, Lowik CW, et al.1993, Rabenberg VS et al, 2002].

Pour cela :

- ✓ Faire dissoudre 1 mg de poudre de Rouge Neutre dans 100 µl de MeOH et compléter le volume à 10 ml avec du iRPMI en milieu stérile.
- ✓ Vortexer et centrifuger solution de Rouge Neutre au 2000 tours/min, 4 °C, 5 min et la placer à 37 °C jusqu'à son utilisat ion (avant 24 h).
- ✓ Préparer une solution de sulfate de Lauryl (sodium dodecyl sulfate, détergent) à 1% (1g/100 ml d'eau desionisée).
- ✓ Préparer du tampon "Phosphate Buffered Saline" (PBS) 1X, pH 7.4.
- ✓ Après 72 heures d'incubation, sortir les microplaques de l'étuve. L'atmosphère stérile n'est plus indispensable.
- ✓ Centrifuger les plaques à 1200 tours/min, à 4 °C, 5 min.
- ✓ A l'aide du système d'aspiration ECOM-P 4153 (Eppendorf), aspirer avec précaution le surnageant contenu dans chaque puit.
- ✓ A l'aide de la multipipette, rajouter 100 µl de la solution de Rouge Neutre dans chaque puit à lire.
- ✓ Incuber les microplaques à 37° C pendant 60 min. Surveiller la coloration rouge du milieu.
- ✓ Centrifuger de nouveau les plaques à 1200 tours/min, 4°C, 5 min.
- ✓ Aspirer le surnageant et rajouter 100 µl de PBS dans chaque puit à lire afin d'éliminer le reste de Rouge Neutre.
- ✓ Centrifuger à 1200 tours/min, 4 °C, 5 min puis aspirer le surnageant.
- ✓ Rajouter 100 µl de sulfate de Lauryl et mettre les microplaques sous agitation à 600 – 800 tours/min, 10 min.
- ✓ Lire enfin la DO à 540 nm au lecteur de plaque couplé à un spectrophotomètre (TITERTEK TWINREADER).

1.2.2- Expression des résultats : Évaluation de la Cl₅₀

L'activité cytotoxique potentielle de chaque extrait végétale est évaluée sur la base de la valeur de la Cl₅₀ correspondante (concentration inhibant 50% la prolifération cellulaire) déterminée à partir de la représentation graphique du pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration testée.

Les résultats sont exprimés en Moyenne \pm l'écart type.

RESULTATS

I- ENQUETES ETHNOBOTANIQUES

Nos enquêtes ont permis d'obtenir des informations sur les plantes les plus utilisées, leurs indications thérapeutiques et leurs utilisations traditionnelles.

A- RECENSEMENT DES PLANTES MEDICINALES DANS LES SITES D'ETUDES

- 202 plantes ont été recensées et dits comme étant utilisées par la population locale de la Région. Après triage des plantes en tenant compte de l'habitat aquatique, 49 espèces appartenant à 47 genres et 37 familles sont des plantes aquatiques et semi-aquatiques utilisées dans la médecine traditionnelle. La famille des Cyperaceae prédomine. Parmi les espèces recensées, 7 sont endémiques (en astérisque) (Tableau 5 en annexe).

La décoction est l'un des modes de préparations le plus utilisé. Les indications thérapeutiques constatées sont des maladies courantes telles que le paludisme, la fièvre, les maux de tête, les maux de ventre, les maux d'estomac, l'entorse. Il y a aussi le problème d'accouchement et la règle douloureuse.

L'ensemble des informations recueillies sur les plantes les plus utilisées nous a permis de sélectionner celle qui fera l'objet de notre étude. Il s'agit d'une plante aquatique et endémique de Madagascar nommée *Hydrostachys plumosa* (HYDROSTACHYACEAE) dont les caractéristiques spécifiques sont résumées dans le Tableau II. Ce sont des plantes herbacées, aquatiques et calcifuges qui poussent dans les torrents de Madagascar.

**Tableau II : Caractéristiques de l'*Hydrostachys plumosa*
(HYDROSTACHYACEAE)**

Espèce, famille, nom vernaculaire	Partie utilisées	Maladies traitées	Utilisations
<i>Hydrostachys plumosa</i> . HYDROSTACHYACEAE “Rondra”	Plante entière	Fatigue Manque d'appétit Maux de ventre Maladie de l'utérus Cosmétique	Décoction

B- MODE D'UTILISATION TRADITIONNELLE

L'*Hydrostachys plumosa* est très utilisée en médecine traditionnelle dans la Région SOFIA mais son indice d'utilisation est peu élevé à Mandritsara comparé à celui d'Antsohihy.

La décoction de la plante atténue la fatigue et les maux de ventre. Elle est également utilisée pour traiter différentes pathologies liées à l'utérus et l'anorexie (manque d'appétit).

Pour toutes ces maladies citées, le malade doit prendre trois tasses de décocté de la tige, feuille et racine de l'*Hydrostachys plumosa*. par jour pendant trois jours.

Le produit de la décoction d'*Hydrostachys plumosa* est aussi utilisé pour tresser et traiter la chute des cheveux.

II – ETUDES CHIMIQUES

A- CRIBLAGES PHYTOCHIMIQUES

Les différents tests chimiques effectués sur l'*Hydrostachys plumosa* (Tableau III) indiquent que la plante ne contient pas :

- ✓ d'alcaloïdes,
- ✓ d'ammoniums quaternaires et des N-oxydes
- ✓ de flavonoïdes et de leucoanthocyanes

- ✓ de tanins et de polyphénols
- ✓ de quinones,
- ✓ de saponines
- ✓ de polysaccharides.

Par contre, l'addition de solution saturée d'antimoine entraîne l'apparition d'une fluorescence jaune (Tableau III) indiquant la présence de stéroïdes dans la plante étudiée.

De plus, après addition de 3 à 4 gouttes d'anhydride acétique et 3 à 4 gouttes de H_2SO_4 (Test de Liebermann Buchard), le résultat obtenu indique la présence de triterpеноïdes dans l'*Hydrostachys plumosa* (Tableau III).

Enfin, le test de Salkowski a permis de démontrer la présence de stérols insaturés dans l'*Hydrostachys plumosa* (Tableau III).

B- ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Le test de révélation de composés antioxydants réalisé sur l'*Hydrostachys plumosa* n'a pas abouti à la formation de coloration jaune indiquant l'absence de ces molécules dans la plante étudiée.

Cependant, après utilisation de la vanilline comme révélateur, des colorations violettes, bleu-vert et vertes ont été observées confirmant la présence des stéroïdes et de triterpеноïdes déjà mis en évidence lors du criblage phytochimique.

Tableau III. Criblage phytochimiques de l'*Hydrostachys plumosa*.

Criblage		Alcaloïdes											
Test	Macération	Préalinaire			Confirmation			N + IVnaire					
Réactifs	W	M	D	W	M	D	W	M	D	W	M	D	
Résultats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Criblage	Flavonoïdes et Leucoanthocyanes			
Réactifs	W	W	BS1	BS2
Résultats	-	-	-	-

Criblage	Tanins et Polyphénols			
Réactifs	g	gs	Fe	am
Résultats	-	-	-	-

Criblage	Stéroïdes et Terpénoïdes					
Réactifs	as	LB	S	BK	KK	mo
Résultats	+	+	+	-	-	-

W: Wagner, M: Mayer, D: Dragendorff, WM: Wilstater modifié, BS: Batsmith, g: Gelatine, gs: gelatine salée, Fe: FeCl_3 10%, as: solution saturée d'antimoine, LB: Liebermann Burchard, S: Salkowski, BK: Badjet Kedde, KK: Keller- Killiani, Mo: mousse a: alcool.

(-) : Test négatif : sans précipitation ; sans coloration ; $0 \leq$ indice de mousse $\leq 2\text{cm}$.

(+) : Test positif : présence de précipitation ; coloration forte ; $2 \leq$ indice de mousse $\leq 4\text{cm}$

III – ETUDES PHARMACOLOGIQUES

A- ACTIVITE ANTIPALUDIQUE

La parasitémie après traitement des souris par l'extrait brut méthanolique de l'*Hydrostachys plumosa* pendant 3 jours a été évaluée à 46% alors que celle des souris "témoins" a été de 42%. Ce résultat indique que l'*Hydrostachys plumosa* n'a aucun effet sur la viabilité des parasites *yoelii* et par conséquent, elle ne présente aucun intérêt dans le domaine de la lutte contre le paludisme.

B- TEST ANTIHISTAMINIQUE

L'activité relaxante de l'extrait méthanolique de l'*Hydrostachys plumosa* vis-à-vis de la trachée du cobaye préalablement contractée par l'histamine (10^{-5} M) est représentée dans le Tableau IV et illustrée par la Fig. 4. La valeur de CE_{50} (Concentration Efficace produisant 50% de relaxation) estimée à partir la Fig. 4 est approximativement de l'ordre de 1125 μ g/ml.

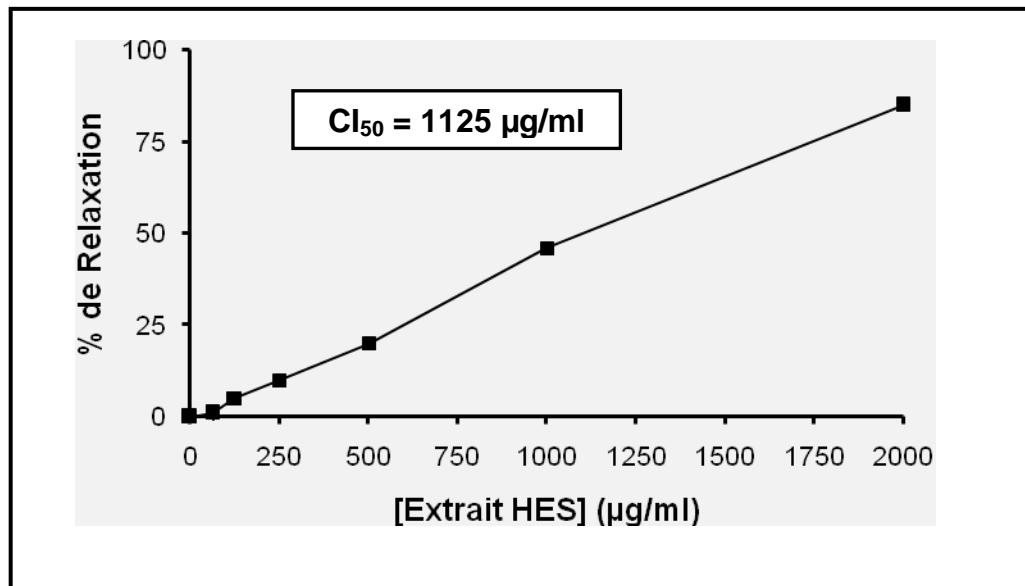


Figure 4. Effet relaxant de l'extrait de l'*Hydrostachys plumosa* vis-à-vis de la trachée de cobaye précontractée par l'histamine. La trachée est préalablement contractée avec une solution d'histamine à 10^{-5} M. Au plateau de contraction, l'effet relaxant est suivi par ajout de concentration croissante (62.5 à 2000 μ g/ml) d'extrait de l'*Hydrostachys plumosa* dans un volume total de 20 ml.

C- TEST DE CYTOTOXICITE

La cytotoxicité de l'*Hydrostachys plumosa* vis-à-vis des cellules P388 a été évaluée à partir de quatre extraits bruts différents.

Comme illustré par la Fig. 5 et indiqué dans le Tableau IV, tous les extraits testés sont actifs. Les valeurs de Cl_{50} déterminées à partir de la Fig.5 sont approximativement de $13,8 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$, $17,5 \pm 6,5 \mu\text{g/ml}$, $22,5 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$ et $16,0 \pm 4,5 \mu\text{g/ml}$ pour les extraits hexanique (A), dichlorométhanique (B), acétate d'éthyl (C) et méthanolique (D), respectivement (Tableau IV).

Tableau IV- Activité cytotoxique de l'*Hydrostachys plumosa* vis-à-vis des cellules P388.

*Extrait	**Cl_{50} (Moyenne \pm SD) ($\mu\text{g/ml}$)
Hex	$13,8 \pm 3,8$
DCM	$17,5 \pm 6,5$
AcEt	$22,5 \pm 2,5$
MeOH	$16,0 \pm 4,5$

*Hex : extrait héxanique ; DCM : extrait dichlorométhanique ; AcEt : extrait d'acétate d'éthyle et MeOH : extrait méthanolique.

**Les valeurs de Cl_{50} (concentration inhibant à 50% la prolifération des cellules P388) ont été extrapolées des graphes représentant le pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration en extraits testés (Fig. 2). Chaque valeur représente la moyenne \pm l'écart type de 3 déterminations indépendantes.

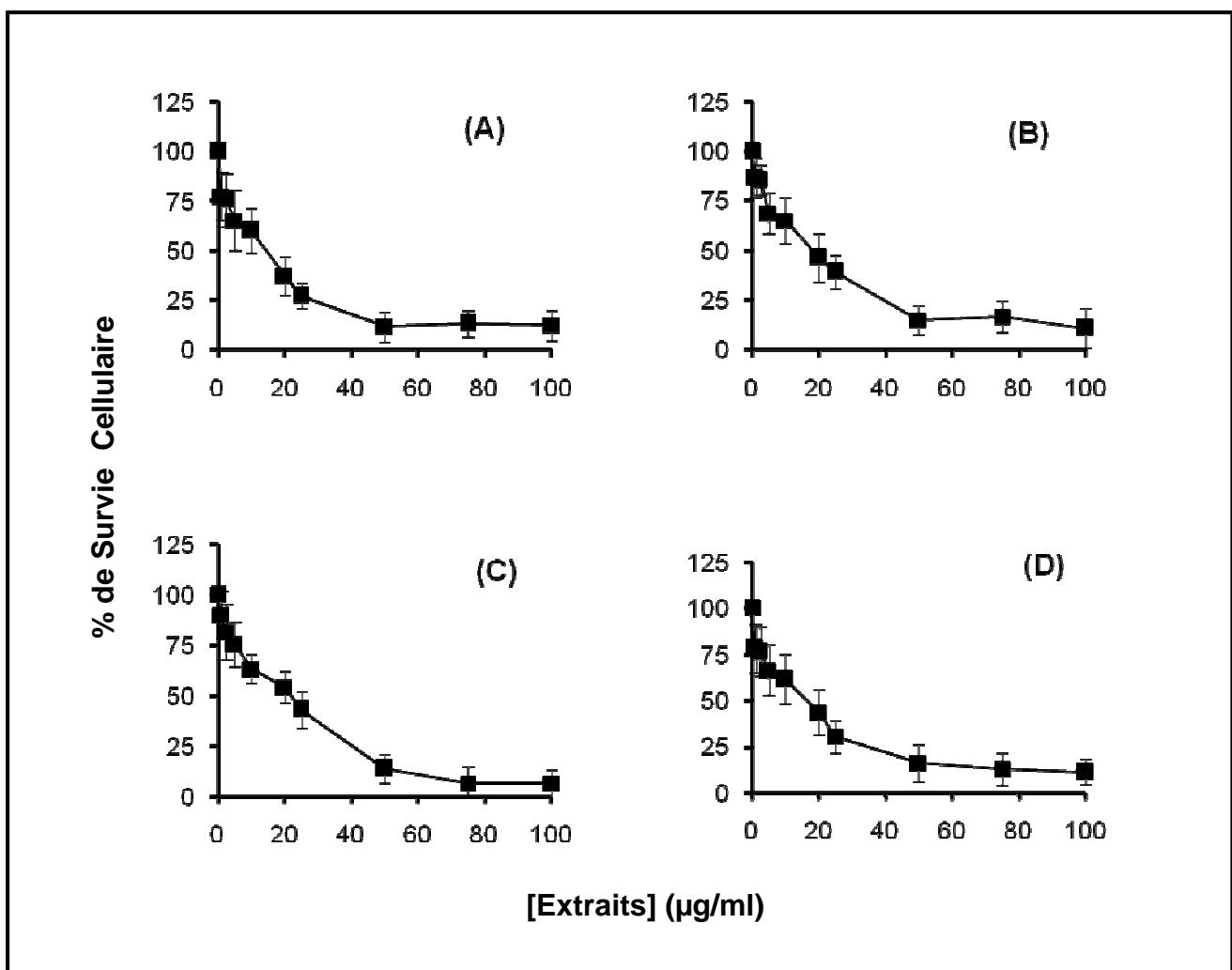


Figure 5. Effet cytotoxique de différents extraits de l'*Hydrostachys plumosa* vis-à-vis des cellules P388. Les cellules ont été incubées pendant 72 h à 37° C sous une atmosphère composée de 5% de CO₂ en présence (essais) ou en absence (contrôle) de concentrations croissantes (1 à 100 µg/ml) en extraits bruts hexanique (A), dichlorométhanique (B), acétate d'éthyle (C) et méthanolique (D). Chaque concentration a été testée sur 4 puits et chaque point représente la moyenne ± l'écart type de 3 déterminations indépendantes. Les pourcentages de survie cellulaire ont été évalués par rapport au contrôle. Pour tous les tests effectués, la camptothécine (5 µM) a servi de contrôle positif.

DISCUSSION

Concernant l'étude botanique, l'*Hydrostachys plumosa* est presque identique au *Hydrostachys pinnatifolia* mais elle diffère par la forme des émergences de la feuille, la taille des feuilles. La structure des feuilles dans les deux espèces est identique. Les bractées des fleurs femelles et mâles sont identiques dans les deux espèces.

Le mode d'emploi des plantes aquatiques médicinales est souvent en mélange avec des plantes terrestres.

D'après notre enquête ethnobotanique réalisée auprès de la population locale dans la Région SOFIA, on utilise l'*Hydrostachys plumosa* pour traiter les cheveux et aussi pour tresser. Par conséquent, elle est non seulement employée pour les traitements mais aussi comme cosmétique. Le test de confirmation de connaissance empirique de ce produit n'a pas encore été effectué.

Les différents tests chimiques effectués sur l'*Hydrostachys plumosa* indiquent que la plante ne contient pas d'alcaloïdes, d'ammoniums quaternaires et des N-oxydes de flavonoïdes et de leucoanthocyanes de tanins et de polyphénols, de quinones, de saponines et de polysaccharides. Cependant, durant le test antihistaminique, on a observé une augmentation de la hauteur de la mousse indiquant probablement l'existence de saponines dans cette plante. De plus, lors de la réalisation du test antioxydant et après utilisation de la vanilline comme révélateur, on a observé des colorations bleu-vert et verte indiquant la présence de tanins condensés et d'autres types de composés phénoliques, respectivement.

L'activité relaxante de l'extrait méthanolique de l'*Hydrostachys plumosa* vis-à-vis de la trachée du cobaye préalablement contractée par l'histamine correspond à une valeur de $CE_{50} = 1.125 \text{ mg/ml}$ (Fig.4). S'agissant d'une expérience préliminaire, il n'est pas possible à partir de cette valeur d'affirmer s'il s'agit d'une activité antiasthmatique réelle. Par conséquent, il serait intéressant d'effectuer ultérieurement, des études complémentaires et plus approfondies utilisant notamment des produits antiasthmatiques de référence afin de confirmer le phénomène observé. Néanmoins, ce résultat obtenu renforce davantage l'intérêt de l'utilisation de l'*Hydrostachys plumosa* en médecine traditionnelle dans la Région SOFIA.

Le test de cytotoxicité que nous avons effectués ont démontré que l'*Hydrostachys plumosa* était suffisamment cytotoxique (Fig. 5 ; Tableau IV) qu'elle mérite d'être étudiée de manière plus approfondie dans le domaine de la

chimiothérapie anticancéreuse. Dans ce contexte, l'extrait héxanique apparaît le plus actif avec une valeur de $Cl_{50} = 13.8 \pm 3.8 \mu\text{g/ml}$. A l'opposé, l'extrait acétate d'éthyl (C) s'avère le moins cytotoxique avec une valeur de $Cl_{50} = 22.5 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$. D'autre part, les extraits dichlorométhanique (B) et méthanolique (D) présentent approximativement les mêmes valeurs de Cl_{50} ($17.5 \pm 6.5 \mu\text{g/ml}$ vs $16.0 \pm 4.5 \mu\text{g/ml}$) indiquant probablement l'existence de deux molécules cytotoxiques de polarités différentes.

Pour cette plante, il faudrait d'abord, effectuer des études de fractionnements bioguidés pour isoler et purifier la ou les molécule(s) active(s). Il faudrait ensuite, évaluer l'activité de ces molécules envers les cellules tumorales humaines, sur un plus grand nombre de lignées cellulaires issues de différentes tumeurs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cinquante espèces aquatiques et semi-aquatiques ont été recensées comme étant médicinales dans la région de Mandritsara, d'Antsohihy et de Port-Bergé. Il s'agit des plantes rencontrées soit dans les rivières, les lacs ou dans les zones temporairement inondées telles que les rizières, les étangs, les mares et les marais. Les parties utilisées peuvent être des feuilles ou des tiges ou des racines ou des plantes entières. La décoction est la préparation la plus fréquente. Ces plantes sont souvent employées pour des maladies courantes. Elles sont en mélange avec des plantes terrestre quelquefois.

L'ensemble des résultats des différents tests phytochimiques confirme les grands intérêts de l'utilisation de l'*Hydrostachys plumosa* en médecine traditionnelle dans la Région SOFIA.

Cependant, s'agissant de tests préliminaires, il serait intéressant d'effectuer des études plus approfondies pour confirmer ces résultats. En ce qui concerne les différents tests d'évaluation d'activités pharmacologiques, les résultats obtenus ont démontré que l'*Hydrostachys plumosa* n'avait aucun effet inhibiteur sur la viabilité des parasites *yoelii* infestés chez la souris indiquant que la plante n'avait probablement pas de propriété antipaludique. Par contre, elle exercerait d'une part, un effet relaxant vis-à-vis de la trachée de cobaye préalablement contractée par l'histamine avec une valeur de CE_{50} de 1125 mg/ml (extrait MeOH) indiquant probablement une activité antiasthmatique et d'autre part, un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules cancéreuses P388 avec des valeurs appréciables de CI_{50} de $13.8 \pm 3.8 \mu\text{g/ml}$, $17.5 \pm 6.5 \mu\text{g/ml}$, $22.5 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ et $16.0 \pm 4.5 \mu\text{g/ml}$ pour les extraits Hex, DCM, AcEt et MeOH, respectivement, suggérant une activité cytotoxique exercée par la plante étudiée.

Du point de vue thérapeutique, l'*Hydrostachys plumosa* pourrait être considérée comme une candidate potentielle dans la chimiothérapie. Elle est suffisamment cytotoxique pour l'étudier dans le domaine de la lutte contre le cancer. Une telle application nécessiterait alors de nombreuses connaissances supplémentaires sur cette plante :

- études de fractionnements bioguidés afin d'isoler et de purifier la molécule active ;
- études *in vitro* de sa cytotoxicité, sur un plus grand nombre de lignées cellulaires (cancéreuses ou normales) animales et surtout humaines afin de confirmer son activité cytotoxique préférentielle envers les cellules tumorales ;

- évaluation *in vitro* de sa capacité à induire l'apoptose (processus biologique d'autodestruction de la cellule) des cellules cancéreuses ;
- études *in vivo* de sa cytotoxicité sur des tumeurs murines et/ou humaines implantées chez l'animal ;
- détermination du mécanisme d'action biologique gouvernant l'activité antitumorale confirmée.

Le grand intérêt de ces travaux, c'est de nous avoir permis de nous familiariser aux différentes techniques utilisées dans le domaine d'études des plantes médicinales. De plus, ils apportent une meilleure connaissance sur la plante aquatique, *l'Hydrostachys plumosa*, permettant d'appréhender les problèmes liés à son utilisation en médecine traditionnelle. Enfin, ces travaux contribuent à la valorisation de la biodiversité végétale de la Région SOFIA et par conséquent, de Madagascar.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ANTONIO, ALMEIDA, MEHTA A. 2001.** Malaria and anaemia. *Postgraduate Doctor Africa.*; 23 (3):p 61-63.
2. **BECKER H, LOERS E, HELMKE K, et al., 1986.** Therapy of rheumatic diseases with inosiplex". *Immun Infekt.*,14(3): p 93-9.
3. **BIRD C.W., LYNCH J.M., PIRT F.J., AND REID W.W.,1971.** Steroids and squalene in Methylococcus capsulatus grown on methane, *Nature*, vol. 230(5294): p 473-474.
4. **BRUNETON J., 1999.** *Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales* , Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales, (ISBN 2-7430-0315-4)1120 p.
5. **CHERMEZON H. ,1936.** Flore de Madagascar et des Comores **Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza (Hydrostachyaceae).** *Ann of Bot* N° 90. : p 157-163.
6. **CUSSET C .,1973.** *Révision des Hydrostachyaceae.* *Adansonia*,sér. 2,13 (1) 75-119.
7. **ERIC E., 2002.** Recherches de substances induisant l'Apoptose. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du grade de Licencié en Kinésithérapie et Réadaptation. Université de Liège. 63p.
8. **FAHY E., SUBRAMANIAM S., BROWN H.A., GLASS C.K., MERRILL A.H. JR., MURPHY R.C., RAETZ C.R., RUSSELL D.W., SEYAMA Y., SHAW W., SHIMIZU T., SPENER F., VAN MEER G., VANNIEUWENHZE M.S., WHITE S.H., WITZTUM J.L., DENNIS E.A., 2005.** A comprehensive classification system for lipids, *J Lipid Res.*, vol. 46(5): p 839-861.
9. **GIULIA P. L. B et ARIO C., 2006.** Enquête ethnobotanique sur les souvenirs et savoirs populaires liés aux plantes médicinales dans la région méridionale alpine de la Suisse (Canton de Tessin).*Bull, Soc, Fr, Ethnopharmacol, Soc, Europ, Ethnopharmacol*, n°38. (ISSN: 1261-4572) p 50-58.
10. **HAAVISTO M., 2009 .**Immunostimulant Drugs for Autoimmune Disease Safer Alternatives to Steroids and Other Immunosuppressive Treatment.
11. **HANBALI F. EL, HASSANYA B. EL, MELLOUKIA F, RHALABIB N., BESSIB H., HEIMEUR. N., IDRISI HASSANI. L. M. ET SERGHINI. M. A., 2006.** Prospection de l'activité antifongique d'extraits de *Pyrus mamorensis*. Aper rech scient BIOTECH. 2 p
12. **JOSEPH H., BOURGEOIS P., PORTECOP J., 2006.** La reconnaissance, la validation et la valorisation des plantes médicinale de la Guadeloupe.

Bull, Soc, Fr, Ethnopharmacol, Soc , Europ, Ethnopharmacol, n°38. (ISSN : 1261-4572). p 30 – 34

13. **Journal Officiel : Août 2003**, « PROVINCE AUTONOME DE MAHAJANGA » (Projection 2002, Base RGPH 1993).
14. **MANUILA L., MANUILA A., LEWALLE P., NICOULIN M., 2001**. Dictionnaire médicale 9^e éd. Masson, Paris. p 678.
15. **MARKOWITZ CE, SPITSIN S, ZIMMERMAN V, ET al., 2009** . The treatment of multiple sclerosis with inosine. *J Altern Complement Med.*; 15(6): p 619-25.
16. **MAZIER D., 1991**. Cycle et Biologie des Plasmodiums in : Danis M., Mouchet J. Paludisme : Médecine tropicale. Ellipses : p 25-33.
17. **MOAT J. ET SMITH. , 2007**. Atlas de vegetation de Madagascar.
18. **NING Z. and WANG Z., 1997**. An assay for DNA fragmentation in Apoptosis without Phenol/Chloroform extraction and ethanol precipitation. *Anal Biochem* 246: p 155-158.
19. **O.M.S, 2005**. Stratégie de l'O.M.S pour la Médecine Traditionnelle
20. **PEARSON A., BROCKS J.J., and BUDIN M., 2003**. Phylogenetic and biochemical evidence for sterol biosynthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 100(26): p 15352–15357.
21. **PERRIER DE LA BÂTHIE H., 1952**. Flore de Madagascar et des Comores 88-89^e Famille.
22. **PERRIER DE LA BÂTHIE H., 1952**. Flore de Madagascar (HYDROSTACHYACEES) 88-89^e Famille. 30p.
23. **PETERS W. et COL., 1975**, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69: p 155-171
24. **RAKOTONIRINA H., RASOANAIVO N.H., RANDRIASAMIMANANA J.R., 2005**. Situation de la médecine et de la pharmacopée traditionnelles à Madagascar. Pharmacopée et médecine traditionnelles. *ethnopharmacologia* n°36. Dossier spécial Madagascar.
25. **RANARIJAONA H.L.T., 1999**. La flore des milieux lenticques (lacs, marais, et étangs) de Madagascar : typologie. Thèse de Doctorat. Université d'Antananarivo.167p .
26. **Réseau Médicaments et Développement (ReMeD)**. n°39 janvier 2009].
27. **RINALDI A. 2004**. Fighting malaria at the crossroads. *EMBO Report*, 5: p 847-851.
- 28- **RIVIERE C-, NICOLAS J.P, CARADEC M.L, DESIRE O, et SCHMITTA, 2006** . Les plantes médicinales de la région Nord de Madagascar : une

28. approche Ethnopharmacologie. Bull, Soc, Fr, d'Ethnopharmacol, Soc, Europ Ethnopharmacol, n°36 : p 36, 49.
29. **ROGIER C., FUSAÏT T., PRADINES B. 2001.** Epidémiologie du paludisme grave in : SAISSY J.M. Paludisme grave. Paris, Arnette : p 23-39.
30. **ROGIER C., PARZY D., SPIEGEL A. 2001.** Histoire naturelle et épidémiologie du paludisme in : Saissy J.M. Paludisme grave. Paris Arnette :p 1-22.
31. **SCATTERED, NOT S. SOUTH AMERICA** (map: see van Steenis & van Balgooy 1966; Aubréville 1974; George 1984; Meusel et al. 1978; Hultén & Fries 1986; Xiang & Thomas 2008). Podostemonaceae, Hydrostachyaceae. [Photos - Habit, Photo: Cornus Inflorescence, Flower, Fruit.].
32. **SCHOUTEN S., BOWMAN J.P., RIJPSTRA W.I., and SINNINGHE DAMSTE J.S., 2000.** Sterols in a psychrophilic methanotroph *Methylosphaera hansonii*, *FEMS Microbiol Lett.*, vol. 186(2): p 193-195.
33. **SMITH JP, STOCK H, BINGAMAN S, ET AL., 2007.** Low-dose naltrexone therapy improves active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* ; 102(4): p 820
34. **STANNARD, B.L., 1997.** Hydrostachyaceae : Hydrostachyaceae *FZ* 9(2)
35. **TRAPE J.F.2001.** The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg*; p 62 (sous presse).

WEBBOGRAPHIE

- 1- [
- 2- [http://www.sofia.gov.mg/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=12
- 3- <http://sofia-sim.org/index.php?id=306>

ANNEXES

Annexe 1 : TEST D'ACTIVITE ANTIHISTAMINIQUE DE L'Hydrostachys plumosa	1
Annexe 2 : TEST DE CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT HEXANIQUE DE l'Hydrostachys plumosa (HES) SUR DES CELLULES CANCEREUSES P388.....	2
Annexe 3 : TEST DE CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT DICHLOROMETHANIQUE DE l'Hydrostachys plumosa (HES) SUR DES CELLULES CANCEREUSES P388.....	4
Annexe 4 : TEST DE CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT ACETATE D'ETHYL DE l'Hydrostachys plumosa (HES) SUR DES CELLULES CANCEREUSES P388.....	6
Annexe5 : TEST DE CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE DE l'Hydrostachys plumosa (HES) SUR DES CELLULES CANCEREUSES P388.....	8
Annexe 6 : LISTE DES PLANTES MEDICINALES AQUATIQUES UTILISEES DANS LES DISTRICTS DE MANDRITSARA , D'ANTSOHIHY ET DE PORT- BERGE.....	10
Annexe 7 : FICHE D'ENQUETE POUR LA MEDECINE TRADITIONNELLE.....	16
Annexe 8 : FICHE DE COLLECTE DES DONNEES.....	20
Annexe 9 : ILLUSTRATIONS PHOTOGRAPHIQUES.....	22

ANNEXES

Annexe 1 : TEST D'ACTIVITE ANTIHISTAMINIQUE DE L'Hydrostachys plumosa

Extrait (µg/ml)	Relaxation (%)
0	0
62.5	1
125	5
250	10
500	20
1000	46
2000	85

Annexe 2 : TEST DE CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT HEXANIQUE DE l'Hydrostachys plumosa (HES) SUR DES CELLULES CANCEREUSES P388

[Cellules] = 20 000 cellules/puits (200 µl)

Drogues testées : Extraits HES Hex (1-2.5-5-10-20-25-50-75 et 100 µg/ml) Filtrés

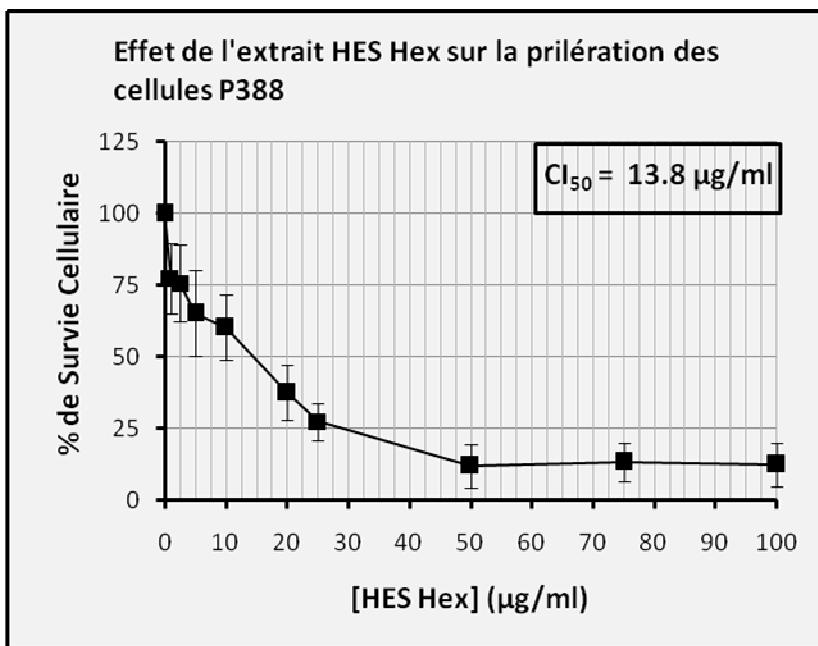
Incubation : 72H

Test de viabilité cellulaire : Rouge Neutre

[HES Hex] (µg/ml)	% de Survie Cellulaire																	
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n ₆	n ₇	n ₈	n ₉	n ₁₀	n ₁₁	n ₁₂	n ₁₃	n ₁₄	n ₁₅	n ₁₆	Moyenne	± SD
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
1,0	66,3	85,2	64,0	71,8	95,6	67,8	73,7	67,4	71,2	78,4	70,3	61,2	87,4	82,4	100,0	95,9	77,4	12,3
2,5	80,9	80,1	81,6	83,7	81,5	58,6	58,8	51,3	93,7	60,4	85,5	73,8	92,6	90,5	74,4	64,9	75,8	13,2
5,0	85,9	75,8	87,5	54,1	65,7	49,6	46,7	50,8	48,4	44,8	74,5	53,9	76,3	79,2	70,3	79,5	65,2	15,1
10,0	70,0	73,9	73,3	61,4	60,2	31,5	48,9	48,3	51,2	60,2	60,2	51,8	66,8	68,6	68,7	68,0	60,2	11,4
20,0	31,9	33,6	37,8	23,7	35,4	39,1	35,4	39,5	43,1	63,9	37,8	24,5	29,0	38,9	49,7	35,4	37,4	9,6
25,0	28,4	23,3	25,1	17,3	27,3	21,3	30,4	26,8	36,4	27,3	27,3	22,1	18,8	30,4	43,0	32,2	27,3	6,5
50,0	23,4	2,8	5,0	5,0	24,1	9,0	6,8	13,2	29,3	9,1	5,8	14,4	13,5	8,6	10,9	9,3	11,9	7,6
75,0	8,0	4,0	4,5	7,3	29,8	15,4	14,8	19,8	12,0	12,3	11,1	10,0	20,6	15,1	18,3	8,9	13,2	6,7
100,0	6,4	2,5	4,0	0,9	12,4	18,1	23,0	28,7	17,7	11,1	14,2	10,1	9,0	18,3	14,8	6,7	12,4	7,6
CPT (5 µM)	3,3	4,9	4,1	3,5	8,4	5,5	13,7	12,3	9,4	12,9	7,8	7,8	16,7	10,1	5,6	6,0	8,3	4,0

[HES Hex]	% d'Inhibition																
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n ₆	n ₇	n ₈	n ₉	n ₁₀	n ₁₁	n ₁₂	n ₁₃	n ₁₄	n ₁₅	n ₁₆	Moyenne

(μ g/ml)																			
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
1,0	33,7	14,8	36,0	28,2	4,4	32,2	26,3	32,6	28,8	21,6	29,7	38,8	12,6	17,6	0,0	4,1	22,6	12,3	
2,5	19,1	19,9	18,4	16,3	18,5	41,4	41,2	48,7	6,3	39,6	14,5	26,2	7,4	9,5	25,6	35,1	24,2	13,2	
5,0	14,1	24,2	12,5	45,9	34,3	50,4	53,3	49,2	51,6	55,2	25,5	46,1	23,7	20,8	29,7	20,5	34,8	15,1	
10,0	30,0	26,1	26,7	38,6	39,8	68,5	51,1	51,7	48,8	39,8	39,8	48,2	33,2	31,4	31,3	32,0	39,8	11,4	
20,0	68,1	66,4	62,2	76,3	64,6	60,9	64,6	60,5	56,9	36,1	62,2	75,5	71,0	61,1	50,3	64,6	62,6	9,6	
25,0	71,6	76,7	74,9	82,7	72,7	78,7	69,6	73,2	63,6	72,7	72,7	77,9	81,2	69,6	57,0	67,8	72,7	6,5	
50,0	76,6	97,2	95,0	95,0	75,9	91,0	93,2	86,8	70,7	90,9	94,2	85,6	86,5	91,4	89,1	90,7	88,1	7,6	
75,0	92,0	96,0	95,5	92,7	70,2	84,6	85,2	80,2	88,0	87,7	88,9	90,0	79,4	84,9	81,7	91,1	86,8	6,7	
100,0	93,6	97,5	96,0	99,1	87,6	81,9	77,0	71,3	82,3	88,9	85,8	89,9	91,0	81,7	85,2	93,3	87,6	7,6	
CPT (5 μ M)	96,7	95,1	95,9	96,5	91,6	94,5	86,3	87,7	90,6	87,1	92,2	92,2	83,3	89,9	94,4	94,0	91,8	4,0	



Annexe 3 : TEST DE CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT DICHLOROMETHANIQUE DE l'*Hydrostachys plumosa* (HES) SUR DES CELLULES CANCEREUSES P388

[Cellules] = 20 000 cellules/puits (200 µl)

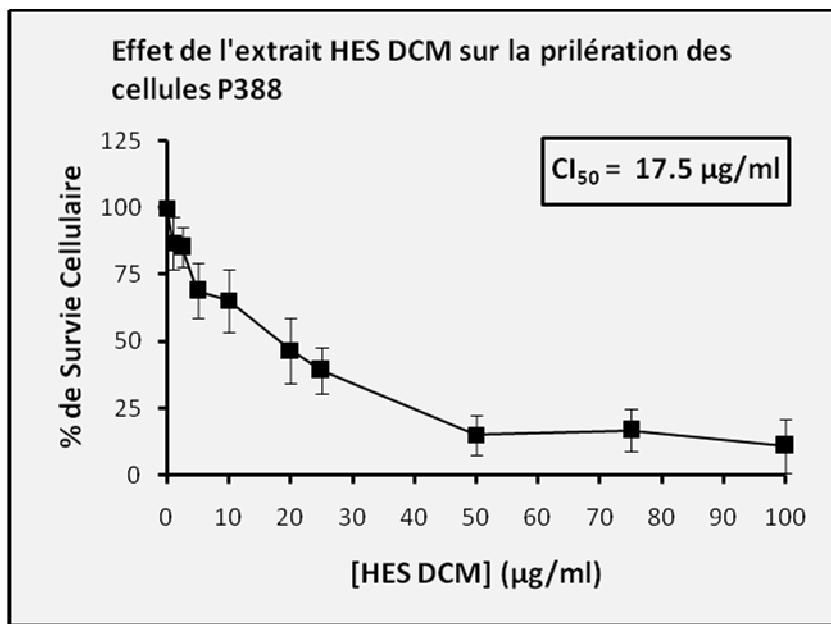
Drogues testées : Extraits HES DCM (1-2.5-5-10-20-25-50-75 et 100 µg/ml) Filtrés

Incubation : 72H

Test de viabilité cellulaire : Rouge Neutre

[HES DCM] (µg/ml)	% de Survie Cellulaire																Moyenne	± SD
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n ₆	n ₇	n ₈	n ₉	n ₁₀	n ₁₁	n ₁₂	n ₁₃	n ₁₄	n ₁₅	n ₁₆		
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
1,0	80,2	87,9	79,8	89,3	100,0	100,0	85,4	73,6	68,9	80,1	100,0	86,4	75,6	95,2	94,0	93,8	86,9	9,9
2,5	72,2	87,4	78,7	83,4	74,2	98,7	80,6	83,8	84,6	84,5	90,8	92,4	79,4	94,6	84,8	96,0	85,4	7,6
5,0	56,6	70,4	66,3	54,9	72,7	80,1	68,9	62,8	81,3	74,1	64,6	93,4	54,3	69,1	70,1	62,9	68,9	10,3
10,0	38,7	57,9	47,3	61,3	72,7	80,1	68,9	62,8	59,7	77,2	75,0	81,5	66,0	67,2	57,7	70,3	65,3	11,6
20,0	54,3	35,2	45,2	44,9	54,3	59,3	46,6	58,4	30,0	51,1	58,0	67,5	32,5	34,2	25,7	48,1	46,6	12,1
25,0	32,7	30,6	28,8	32,5	36,0	56,4	52,6	47,3	32,0	33,0	42,0	32,6	46,6	46,4	34,5	45,1	39,3	8,7
50,0	8,4	7,7	6,9	11,1	27,6	24,9	23,3	24,1	14,5	13,8	14,0	22,5	14,1	10,5	2,6	13,5	15,0	7,4
75,0	3,8	24,2	4,6	6,9	22,1	32,7	13,0	16,6	12,4	18,7	18,4	18,8	22,3	8,4	22,5	21,2	16,7	7,9
100,0	13,3	5,3	2,4	0,8		24,3	27,0	21,6	9,3	23,7	17,9	14,7	0,0	2,3	0,2	0,0	10,9	10,1
CPT (5 µM)	4,1	3,0	1,2	3,4	12,1	5,1	6,3	10,1	6,4	3,2	4,3	1,5	0,0	0,0	0,0	3,8	3,6	

[HES DCM] (µg/ml)	% d'Inhibition																Moyenne	± SD
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n ₆	n ₇	n ₈	n ₉	n ₁₀	n ₁₁	n ₁₂	n ₁₃	n ₁₄	n ₁₅	n ₁₆		
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	19,8	12,1	20,2	10,7	0,0	0,0	14,6	26,4	31,1	19,9	0,0	13,6	24,4	4,8	6,0	6,2	13,1	9,9
2,5	27,8	12,6	21,3	16,6	25,8	1,3	19,4	16,2	15,4	15,5	9,2	7,6	20,6	5,4	15,2	4,0	14,6	7,6
5,0	43,4	29,6	33,7	45,1	27,3	19,9	31,1	37,2	18,7	25,9	35,4	6,6	45,7	30,9	29,9	37,1	31,1	10,3
10,0	61,3	42,1	52,7	38,7	27,3	19,9	31,1	37,2	40,3	22,8	25,0	18,5	34,0	32,8	42,3	29,7	34,7	11,6
20,0	45,7	64,8	54,8	55,1	45,7	40,7	53,4	41,6	70,0	48,9	42,0	32,5	67,5	65,8	74,3	51,9	53,4	12,1
25,0	67,3	69,4	71,2	67,5	64,0	43,6	47,4	52,7	68,0	67,0	58,0	67,4	53,4	53,6	65,5	54,9	60,7	8,7
50,0	91,6	92,3	93,1	88,9	72,4	75,1	76,7	75,9	85,5	86,2	86,0	77,5	85,9	89,5	97,4	86,5	85,0	7,4
75,0	96,2	75,8	95,4	93,1	77,9	67,3	87,0	83,4	87,6	81,3	81,6	81,2	77,7	91,6	77,5	78,8	83,3	7,9
100,0	86,7	94,7	97,6	99,2	100,0	75,7	73,0	78,4	90,7	76,3	82,1	85,3	100,0	97,7	99,8	100,0	89,8	10,1
CPT (5 µM)	95,9	97,0	98,8	96,6	87,9	94,9	93,7	89,9	93,6	96,8	95,7	98,5	100,0	100,0	100,0	96,2	3,6	



Annexe 4 : TEST DE CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT ACETATE D'ETHYL DE l'*Hydrostachys plumosa* (HES) SUR DES CELLULES CANCEREUSES P388

[Cellules] = 20 000 cellules/puits (200 µl)

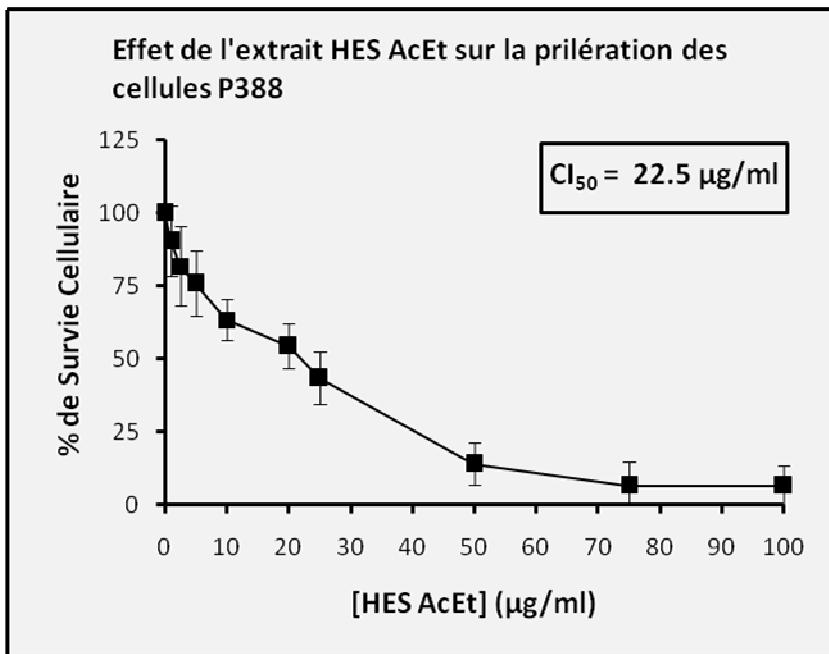
Drogues testées : Extraits HES AcEt (1-2.5-5-10-20-25-50-75 et 100 µg/ml) Filtrés

Incubation : 72H

Test de viabilité cellulaire : Rouge Neutre

[HES AcEt] (µg/ml)	% de Survie Cellulaire													
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n ₆	n ₇	n ₈	n ₉	n ₁₀	n ₁₁	n ₁₂	Moyenne	± SD
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
1,0	80,9	100,0	100,0	87,2	100,0	91,1	64,8	87,6	100,0	100,0	73,0	99,6	90,4	12,1
2,5	58,5	100,0	100,0	68,4	100,0	69,9	79,8	86,3	89,6	81,6	74,6	73,7	81,9	13,7
5,0	72,8	73,5	81,1	66,5	93,3	87,2	54,6	79,7	71,3	88,5	78,5	63,8	75,9	11,1
10,0	63,4	54,1	63,4	70,9	76,2	63,4	67,0	66,8	51,7	57,7	67,9	58,0	63,4	7,1
20,0	51,5	53,1	53,1	53,1	70,5	49,6	62,5	58,8	52,5	60,4	44,5	44,0	54,5	7,5
25,0	51,7	48,0	48,0	44,2	60,1	32,9	37,6	50,6	46,2	32,7	31,5	37,0	43,4	9,0
50,0	9,4	6,8	12,4	15,9	15,5	10,2	7,8	6,7	27,0	11,1	27,5	18,6	14,1	7,2
75,0	26,3	2,9	10,2	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,4	3,8	0,0	15,4	6,6	8,4
100,0	1,2	0,0	11,7	2,0	10,2	1,6	1,1	1,7	20,3	3,5	14,0	12,4	6,6	6,7
CPT (5 µM)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	1,2	8,3	18,9	16,5	7,9	4,6	6,8

[HES AcEt] (μ g/ml)	% d'Inhibition													
	n₁	n₂	n₃	n₄	n₅	n₆	n₇	n₈	n₉	n₁₀	n₁₁	n₁₂	Moyenne	\pm SD
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	19,1	0,0	0,0	12,8	0,0	8,9	35,2	12,4	0,0	0,0	27,0	0,4	9,7	12,1
2,5	41,5	0,0	0,0	31,6	0,0	30,1	20,2	13,7	10,4	18,4	25,4	26,3	18,1	13,7
5,0	27,2	26,5	18,9	33,5	6,7	12,8	45,4	20,3	28,7	11,5	21,5	36,2	24,1	11,1
10,0	36,6	45,9	36,6	29,1	23,8	36,6	33,0	33,2	48,3	42,3	32,1	42,0	36,6	7,1
20,0	48,5	46,9	46,9	46,9	29,5	50,4	37,5	41,2	47,5	39,6	55,5	56,0	45,5	7,5
25,0	48,3	52,0	52,0	55,8	39,9	67,1	62,4	49,4	53,8	67,3	68,5	63,0	56,6	9,0
50,0	90,6	93,2	87,6	84,1	84,5	89,8	92,2	93,3	73,0	88,9	72,5	81,4	85,9	7,2
75,0	73,7	97,1	89,8	94,0	100,0	100,0	100,0	100,0	85,6	96,2	100,0	84,6	93,4	8,4
100,0	98,8	100,0	88,3	98,0	89,8	98,4	98,9	98,3	79,7	96,5	86,0	87,6	93,4	6,7
CPT (5 μ M)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	97,9	98,8	91,7	81,1	83,5	92,1	95,4	6,8



7

Annexe5 : TEST DE CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE DE *l'Hydrostachys plumosa* (HES) SUR DES CELLULES CANCEREUSES P388

[Cellules] = 20 000 cellules/puits (200 μl)

Drogues testées : Extraits HES MeOH (1-2.5-5-10-20-25-50-75 et 100 $\mu\text{g/ml}$) Filtrés

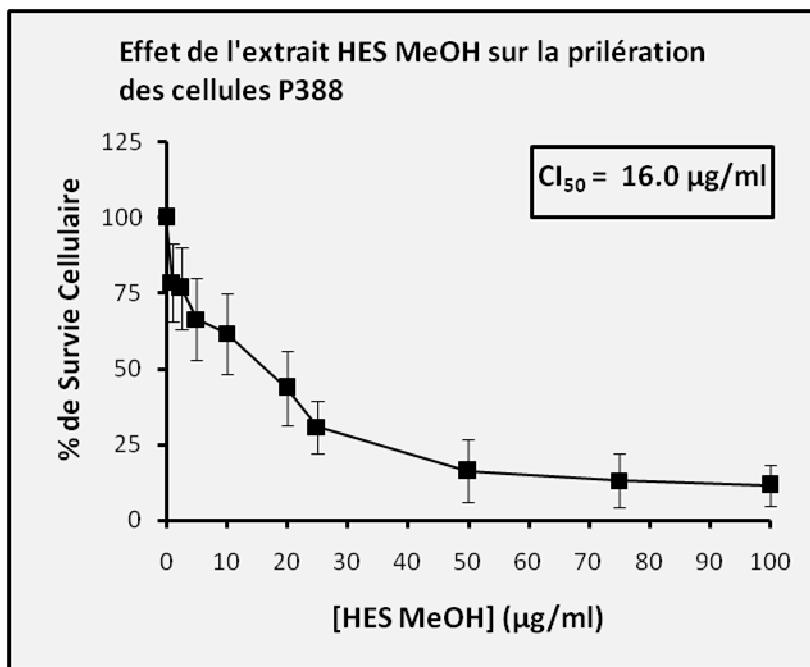
Incubation : 72H

Test de viabilité cellulaire : Rouge Neutre

% de Survie Cellulaire

[HES MeOH] (µg/ml)	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n ₆	n ₇	n ₈	n ₉	n ₁₀	n ₁₁	n ₁₂	Moyenne	± SD
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
1,0	66,3	85,2	64,0	71,8		67,8	73,7	67,4	100,0	96,9	91,4	80,1	78,6	13,0
2,5	80,9	80,1	81,6	83,7	81,5	58,6	58,8	51,3	100,0	82,9	80,9	81,2	76,8	13,6
5,0	85,9	75,8	87,5	54,1	65,7	49,6	46,7	50,8	68,1	70,7	72,5	70,5	66,5	13,7
10,0	70,0	73,9	73,3	61,4	61,7	31,5	48,9	48,3	67,8	78,8	64,1	60,6	61,7	13,3
20,0	31,9	33,6	37,8	23,7	43,8	39,1	43,8	39,5	65,3	57,0	59,8	49,8	43,8	12,3
25,0	28,4	23,3	25,1	17,3	30,7	21,3	30,4	26,8	41,8	41,5	40,7	41,6	30,7	8,7
50,0	23,4	2,8	5,0	5,0	24,1	9,0	6,8	13,2	22,5	23,4	31,5	28,6	16,3	10,3
75,0	8,0	4,0	4,5	7,3	29,8	15,4	14,8	19,8	27,7	9,3	11,3	5,2	13,1	8,7
100,0	6,4	2,5	4,0	0,9	13,8	18,1	11,5	12,5	18,5	21,3	18,4	10,2	11,5	6,9
CPT (5 µM)	3,3	4,9	4,1	3,5	14,0	5,5	13,7	12,3	10,8	11,0	11,2	4,6	8,2	4,2

[HES MeOH] (µg/ml)	% d'Inhibition													
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n ₆	n ₇	n ₈	n ₉	n ₁₀	n ₁₁	n ₁₂	Moyenne	± SD
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0	33,7	14,8	36,0	28,2	100,0	32,2	26,3	32,6	0,0	3,1	8,6	19,9	28,0	25,8
2,5	19,1	19,9	18,4	16,3	18,5	41,4	41,2	48,7	0,0	17,1	19,1	18,8	23,2	13,6
5,0	14,1	24,2	12,5	45,9	34,3	50,4	53,3	49,2	31,9	29,3	27,5	29,5	33,5	13,7
10,0	30,0	26,1	26,7	38,6	38,3	68,5	51,1	51,7	32,2	21,2	35,9	39,4	38,3	13,3
20,0	68,1	66,4	62,2	76,3	56,2	60,9	56,2	60,5	34,7	43,0	40,2	50,2	56,2	12,3
25,0	71,6	76,7	74,9	82,7	69,3	78,7	69,6	73,2	58,2	58,5	59,3	58,4	69,3	8,7
50,0	76,6	97,2	95,0	95,0	75,9	91,0	93,2	86,8	77,5	76,6	68,5	71,4	83,7	10,3
75,0	92,0	96,0	95,5	92,7	70,2	84,6	85,2	80,2	72,3	90,7	88,7	94,8	86,9	8,7
100,0	93,6	97,5	96,0	99,1	86,2	81,9	88,5	87,5	81,5	78,7	81,6	89,8	88,5	6,9
CPT (5 µM)	96,7	95,1	95,9	96,5	86,0	94,5	86,3	87,7	89,2	89,0	88,8	95,4	91,8	4,2



Annexe 6 : LISTE DES PLANTES MEDICINALES AQUATIQUES UTILISEES DANS LES DISTRICTS DE MANDRITSARA , D'ANTSOHIHY ET DE PORT-BERGE.

9

N°	Nomenclature	Habitat	(Indications thérapeutiques)	Port	Personnes cibles	Parties prélevées	Mode de préparation	Prise	Mode de conservation	Observations
1	<i>Adina microcephala</i> Hiern. (Rubiaceae) Sohihy	Berge S15°49.857 E048°48.478	Maux de tête Grippe Paludisme		Adulte Jeunes Enfant	Jeunes feuilles	Piler A mettre le jus dans le nez Décoction et A boire			
2	<i>Ficus sakalavarum</i> (*) Adabo (Moraceae)	Berge S15°49.223 E048°48.143	Cosmétique	Arbuste	Adulte Jeunes Enfant	Ecorce	Râpure			
			Plaie			Latex	En goutte			
			Hernie			Racines adventives	Décoction	½ tasse pt 2 jrs tous les 2 jours		
3	<i>Hydrostachys plumosa</i> A. Juss (*) (Hydrostachyaceae) Rondra	Cours d'eau S15°40 E0 46°23'	Chute de cheveux (Cosmétique)	Herbacé	Adulte Jeunes Enfant	Plante entière	Décoction	Utiliser en tissant les cheveux	A utiliser une fois et à jeter	
			Fatigue							

			Maux de ventre Manque d'appétit							
4	<i>Aframomum angustifolium</i> K. Schum. (Zingiberaceae) Longoza	Berge Etang et eaux stagnantes S15°40' EO 46°23'	Problème d'accouchement	H	A	Racines	Décoction jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune	A boire	A jeter après 4 jours	Avec <i>Fuirena glomerata</i>
			Fatigue	H	A-J	Feuilles				
			Cardiaque		A	Tiges + feuilles	A éplucher Râpure filtrer	A boire		
5	<i>Fuirena glomerata</i> Rottb. (Cyperaceae) Vendramalomona	Rizières- Cours d'eau- Zone marécageuse Lacs S15°49'82"2' EW48°48'500	Problème d'accouchement	H	A	Entière	Décoction	A boire	A jeter après 4 jours	Avec racines de <i>Aframomum</i>
			Fatigue ; articulation		A-E-J	Entière	Décoction	A boire une tasse par jour pendant l'accouchement		
			Maux de ventre Palu					A boire		
6	Batrotroko	Zone humide ou eau stagnante	Maux de ventre	Herbacé	A-E-J	Tige + Feuilles+ fleurs	Décoction	A boire		

7	<i>Cyperus volodiooides</i> Cherm. (Cyperaceae) Volodia (*)	Marais Rizières S15°50.496 EO48°49.050	Accouchement	Herbacé	A	Entière	Décoction			10
8	<i>Phragmites mauritianus</i> (Poaceae) Bararata	Lac-Rivière- cours d'eau- rizière	Yeux	Herbacé	A E J	Feuilles	Griller			
9	Varona	Berge zone humide	Tension	Arbre	A	Feuilles	Décoction	A boire deux fois par jour	Tous les deux jours et reprise après 5 jours	
			Vavony			latex	A boire à jeun une fois par jour			
			Maux de ventre Diarrhée			racines	Décoction	A boire 2 verres au max	Ecorce de manguier	Interdire le sucre
						Feuilles	Décoction ou Infusion à l'eau froide	A boire	Feuille toxique	
10	Mafaimamy	Zone humide	Paludisme	Arbuste	A-J	Feuilles	Décoction	A boire deux		

			Fatigue					fois par jour avant de dormir		
11	<i>Nymphaea lotus</i> (Nymphaeaceae) Agoago (voahirana)	Lacs, Marais	Sédatifs Antidotes	Herbacé	A	Feuilles				
12	<i>Nymphaea stellata</i> (Nymphaeaceae) Tatamo	Lacs, Marais	Aphrodisiaque	Herbacé	A	Tubercules	Décoction	A boire		
13	<i>Pistia stratiotes</i> (Araceae) Azafao	Eau lac étang	Fatigue Antidote	Herbacé	A J E		Rincer la tête	A mettre dans de l'eau froide		
14	<i>Azolla pinnata</i> R.Br. (*) (Azollaceae) Savamikipy	Rizières S15°49.822/ E048°48.500	Hémorroïdes	Herbacé	A	Plante entière	Décoction	Bain de siège		
15	<i>Lemna paucicostata</i> Lin. Ramilamina (Lemnaceae)	Eaux stagnantes	Plaie	Herbacé		Plante entière	Décoction	A mettre sur la plaie		
16	<i>Floscopa glomerata</i> Hassk. (Commelinaceae) Ahbita	Marais - Lac	Fatigue	H			Décoction	A boire		

17	<i>Scirpus juncoides</i> Roxb. (Cyperaceae) Ahidrano	Marais	Herbacé	Antidote Malaise	Adulte	Plante entière	Décoction			11
18	<i>Mimosa pudica</i> L. (Fabaceae) Rotra Sambirano	Zone humide, lac, rizières, bord de cours d'eau	Herbacé	Maux de ventre	Adulte Jeune Enfant	Racines	Décoction			
				blennorragie		Feuilles	Décoction A boire et Bain de siège fréquent			
19	<i>Bacopa monnieri</i> (Scrophulariaceae)	Marais Berge	Herbacé	Améliore la mémoire			Décoction et à boire			
20	<i>Polygonum glabrum</i> (Polygonaceae) Tamboloana	Zone humide - Lac	Diarrhée chez les enfants Amibiase Goutte	Herbacé	Enfant	Feuilles	Décoction	A boire		
21	Akalana	Rizières Zone humide	Fièvre Maux de ventre	H	Enfant	Feuilles	Décoction	A boire		

			Entorse			Décoction concentrée à prendre en bain	Mettre les feuilles sur l'entorse	A mélanger avec de Jeune feuilles de <i>Harungana</i>		Rester immobile pt 1 semaine
22	<i>Raphia farinifera</i> (<i>Arecaceae</i>) Rafia	Zone humide marécageuse	Maux de dents		A-J	Racines	Décoction	A boire	A mélanger avec des Feuilles de <i>Cajanus</i> pilées + Sel	
			Maux de tête		A-E-J	Ecorce (hovaka)	Décoction	A boire pendant deux jours		
			Gouttes		A	Quelques graines	Décoction	A boire		
23	<i>Sopubia trifida</i> Buch. Ham. (<i>Scrophulariaceae</i>) Manondry	Rizières	Favorisant la pousse des dents chez le bébé		E	Racines adventives	Décoction	A boire		
		Maux de tête Maladie vaginale			A-J	Ecorce	Décoction			

24	<i>Ludwigia octovalvis</i> (Jacq.) Raven. (*) (<i>Onagraceae</i>) Rajafotsy	Lacs, marais	Plaie		A-E-J	Feuilles	Piler et filtrer	A mettre sur la plaie			12
----	--	--------------	-------	--	-------	----------	------------------	-----------------------	--	--	----

25	<i>Ludwigia diffusa</i> (<i>Onagraceae</i>) Rajamena	Lacs, marais	Accouchement		A	Plante entière	Décoction	A boire			
26	<i>Crinum firmifolium</i> Bak. var. <i>hygrophylum</i> (*) (<i>Amaryllidaceae</i>) Vahana	Zone humide	Plaie			Bulbe	Piler et filtrer	Sur la plaie			
27	<i>Masonamboatorana</i>	Berge	Toux		Enfant	Feuilles	Décoction A boire	A mélanger avec du poulet			
			Maux d'estomac			Feuilles	Décoction A boire	+ Feuilles de			

			/ Toux				pt 4 jrs 2x par jour	papayer			
28	Sirambalavo	ZH rizière	Toux		Adulte Jeune Enfant	Plante entière	Décoction A boire 1 fois par jr				
29	<i>Phyla nodiflora</i> (<i>verbenaceae</i>) Fitampesamboay	Marais	Maux de ventre Sédatifs		A	Plante entière	Décoction à boire				
30	Babongampiso (<i>Passifloraceae</i>)	S 15°49.786 EO48°48.425 Berge - marais - mare	Tension		Adulte	Plante entière	Décoction A boire	Avec des feuilles de manguier fraîches			
31	<i>Marsilea microphylla</i> (*) (<i>Marsileaceae</i>)	S15°49.822 EO48°48.500 Mare	fatigue		Adulte	Plante entière	Décoction A boire				
32	<i>Ipomoea aquatica</i> (<i>Convolvulaceae</i>) Tsomangarano	S15°50.496 EO48°49.050 Marais									
33	<i>Ludwigia diffusa</i> subsp. <i>Diffusa</i> (<i>Onagraceae</i>) Vilondrano	S15°49.023 EO48°47.984 Marais									

N°	Nom vernaculaire de la plante	Habitat de la plante ou lieu de récolte	Type de maladie (Indications thérapeutiques)	Type ou forme biologique	Personnes cibles (enfant, jeune, adulte)	Parties prélevées	Quantité prélevée Mode de préparation	Mode d'emploi	Mode de conservation	Autres utilisations	Observations
34	Farimainty	ZH	Sindrika (manevika)	A-J-E		Tige	Décoction	A boire fréquemment	Avec du thé		13
35	<i>Rhynchospora candida</i> Boeck. (<i>Cyperaceae</i>) Ahipisaka	Marais Rizières	Diurétique	A-E-J		Jeunes feuilles	Décoction	A boire fréquemment selon l'âge	Feuilles de kelimirefaka (T et ZH)		
36	<i>Scoparia dulcis</i> L. (<i>Scrophulariaceae</i>) Famafantsambo		Contre les fièvres	A		Tiges et feuilles	Décoction	A boire trois fois par jour	A boire 0-5 ans : ½ tasse de café 5-10 : 1 tasses a café 10-100 ans : 2 verres + 4 cac 3 fois par jour	Feuilles de Tsilavondrivotra vahimaintiny Etamines de mais	

37	<i>Ficus sp.</i> (Moraceae) Mandresy	Toute ZH	Maux d'estomac	A-J		Feuilles	Piler et à décocter A boire froid	Avec feuilles ou écorce de <i>Terminalia superba</i>			
38	<i>Scleria racemosa</i> Poir. (Cyperaceae) Sirosera	T ou ZH	Problème d'accouchement			Feuille	Décoction A boire 3 fois par jour				
39	<i>Arthrochnemum indicum</i> Mog. (Chenopodiaceae) Sirasira	Zone humide salée	Problème d'accouchement			Plante entière	Décoction à manger avec le riz				
40	<i>Cyperus articulatus</i> L. (Cyperaceae) Mito	Marais Zones Humides	Problème d'accouchement				Décoction A boire 3 fois par jr	Racines d' <i>Aframomum</i>			
41	Montomaso	Rizières	Contre l'alcool (pour une personne alcoolique)			Feuilles	Décoction A boire				

N°	Nom vernaculaire de la plante	Habitat de la plante ou lieu de récolte	Type de maladie (Indications thérapeutiques)	Type ou forme biologique	Personnes cibles (enfant, jeune, adulte)	Parties prélevées	Quantité prélevée Mode de préparation	Mode d'emploi	Mode de conservation	Autres utilisations	Observations
42	<i>Imperata cylindrica</i> (Poaceae) Maneviky		Tétanos A conseiller aussi après opération			Feuilles	Décoction A boire 2 fois par jour				
43	Vahazato		Albumine			Feuilles	Décoction A boire				
	Kisaka		Tension			Feuilles	Décoction A boire				
44	<i>Lygodium lanceolatum</i> (Schizeaceae) Karakaratoloho	S15°49.517 / EO 48°48.327 Berge	Paludisme Asthme Fatigue Entorse			Entière	Décoction A boire				
						Plante entière	Décoction + aiguille Inhalation de la partie fracturée et masser avec A boire une fois par jour				
45	Tsirangorangobalala	Zone humide	Malaise		Bébé	Feuilles + tiges	Décoction A boire				
46	Rohiavotra	Zone humide	Maux de ventre			Feuilles	Décoction A boire				
47	<i>Colocasia esculenta</i> Scott. (Araceae) Rasaonjo	Marais - Mare	Règle douloureuse				Décoction A boire				
48	<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf. (Equisetaceae)	Marais	Règle douloureuse Dysenterie Diurétique				Décoction A boire				
49	<i>Typhonodorum lindleyanum</i> Schott. (Araceae) Viha	Marais - Lacs	Cancer ou plaie grave			Faux tronc sec ou feuilles	A brûler et le poudre à mettre sur la plaie				
50	<i>Pneumatopteris unita</i> Kunze (Thelypteridaceae) Ampangandrano	Marais - Lacs	Vermifuge			Frondes	Décoction A boire				

ANNEXE 7

Annexe 6 : **FICHE D'ENQUETE POUR LA MEDECINE TRADITIONNELLE**

INFORMATION SUR LA PLANTE

Noms locaux de la plante :

Nom 1 :

Nom 2 :

Nom 3 :

Lieu de récolte

Rizières	<input type="checkbox"/>	Cours d'eau	<input type="checkbox"/>	Lacs	<input type="checkbox"/>
Etangs	<input type="checkbox"/>	Marais	<input type="checkbox"/>	Mare	<input type="checkbox"/>
Autres :.....					

UTILISATIONS DE LA PLANTE

Utilisations de la plante dans la vie quotidienne :

Bois de chauffe	<input type="checkbox"/>	Clôture	<input type="checkbox"/>
Construction de maison	<input type="checkbox"/>	Alimentation humaine	<input type="checkbox"/>
Alimentation des animaux <input type="checkbox"/>			

Autres

Utilisation 6 :

Utilisation 7 :

Utilisation 8 :

Est-ce que cette plante est utilisée en médecine traditionnelle (pour traiter une maladie) ?

Oui

Non

Ne sait pas

Si OUI

Chez qui on utilise le remède ?

Nourrissons/Enfants Adolescents Adultes

Types de maladies traitées ?

Signes cliniques dans la terminologie locale

Paludisme/fièvre	<input type="checkbox"/>
Plaie	<input type="checkbox"/>
Diarrhée	<input type="checkbox"/>
Toux	<input type="checkbox"/>
Lésion cutanée	<input type="checkbox"/>
Maux d'estomac	<input type="checkbox"/>
Maux de tête	<input type="checkbox"/>
Douleur articulaire	<input type="checkbox"/>
Fracture	<input type="checkbox"/>

Maladie vénérienne

Vermifuge

Autres ?

Autre 1 :

Autre 2 :

Autre 3 :

Quelles parties de la plante sont utilisées ?

Ecorce de tige Feuilles Fleurs Racines

Fruits Gomme Résine

Autres :

Mode de préparation du remède

Décoction Râpure

Infusion Broyage

Autres :

Recette :

Notes sur la préparation :

.....
.....

Mode d'utilisation du remède

Quantité administrée :

Voie d'administration :

Fréquence de l'administration :

Durée du traitement :

Durée de conservation du remède :

Plantes associées

Aucune

Oui

Si Oui, lesquelles ?

Notes sur la préparation :

ANNEXE 8
FICHE DE COLLECTE DES DONNEES

A- Informations concernant l'enquête

Nom de l'enquêteur : _____

Type d'enquête : Individuelle ou en groupe

Date de l'enquête	Nom du village	N°	Nom de l'enquêté	Sexe	Age	Situation familiale	Nombre de personne dans la famille	Autres informations

ENQUETE EN GROUPE

Nom de l'enquêteur :

Type groupe :

Date	Nom du village	Nombre des hommes	Nombre des femmes	Nombre total

B – Utilisation proprement dite des plantes

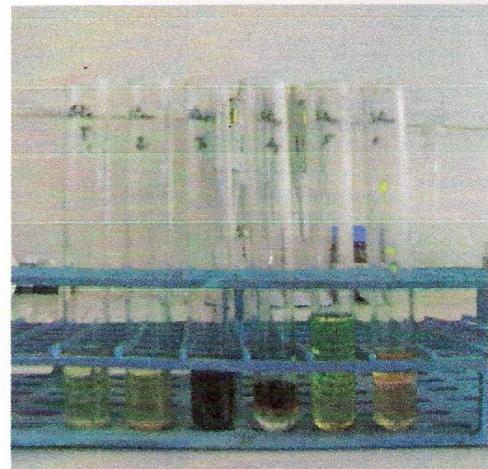
Nom vernaculaire de la plante	Type de maladie (Indication thérapeutique)	Type ou forme biologique	Lieu de collecte	Partie prélevée	Quantité prélevée	Mode de préparation	Mode d'emploi	Mode de conservation

Annexe 9 : ILLUSTRATIONS PHOTOGRAPHIQUES

A- CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE



Macération méthanolique de poudre de l'*Hydrostachys plumosa*

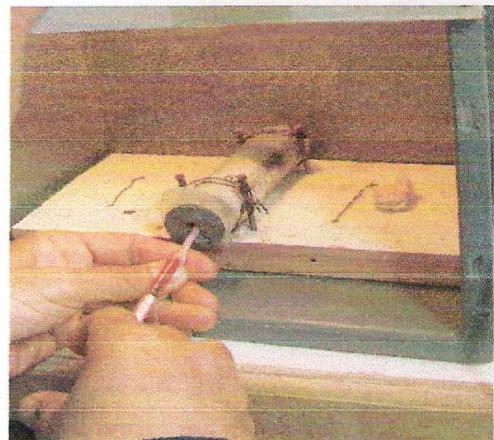


Criblage des stéroïdes et des terpènoïdes

B- TEST IN VITRO ANTIPALUDIQUE CHEZ LA SOURIS



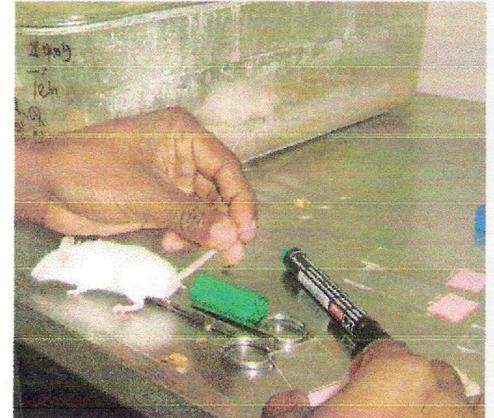
Lots des souris



Impaludation des souris



Traitement des souris infectées par gavage



Faire un frottis mince par sang pressé au niveau de la veine caudale de la souris

TEST ANTIHISTAMINIQUE *IN VITRO* CHEZ LE COBAYE

Cobaye



Montage dans une cuve à organes

D- TEST DE CYTOTOXICITE

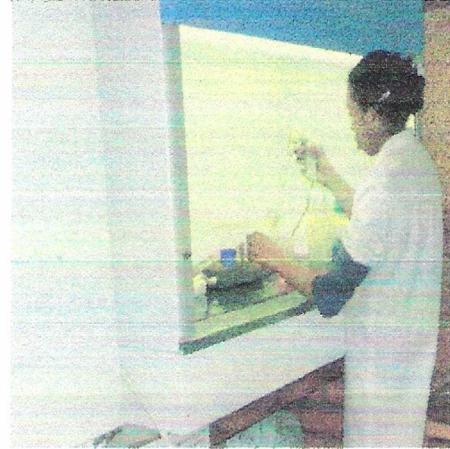
Microplaqué à 96 puits



Centrifugation



Hotte à flux laminaire



Travaillé sous hotte à flux laminaire

SUMMARY

The major part of the Malagasy population uses the plants to be looked after. They are certainly, easily available and inexpensive but the vegetable active substances, are generally used in complex forms of mixtures which one is unaware of in the majority of the cases the active ingredients and their mechanisms of actions like their side effects and possible toxicities. It is in this context that we proposed to carry out phytochimic and ethnopharmacologic studies of *Hydrostachys plumosa* (HYDROSTACHYACEAE), a watery medicinal plant which is very much used in traditional medicine in the SOFIA Area. It is a plant whose decoction is used to attenuate tiredness and to treat the evils of belly and various pathologies related to the uterus as well as the anorexia.

In a first stage, phytochimic siftings carried out on *Hydrostachys plumosa* made it possible to show then this plant was primarily consisted of the steroids, the unsaturated triterpenoïdes and sterols.

In one second stage, pharmacological studies made it possible to show on the one hand, that the extract methanolic of *Hydrostachys plumosa* did not present any antipaludic activity whereas it would carry on an antihistamine activity with a value of CE_{50} of about 1.125 mg/ml probably indicating, a antiasthmatic activity which remains to be studied thoroughly. In addition, the various extracts tested of *Hydrostachys plumosa* showed a sufficient cytotoxic activity (CI_{50} moyenne = $17.5 \pm 3.7 \mu\text{g/ml}$) with respect to the cancerous cells P388 which it could be regarded as a potential candidate in anti-cancer chemotherapy. However, such an application would still require many additional knowledge on this plant.

This study brings a better knowledge on the watery plant, *Hydrostachys plumosa*, thus making it possible to apprehend the problems involved in its use in traditional medicine. Moreover, it contributes to the valorization of the vegetable biodiversity of the SOFIA Area and consequently, of Madagascar. Nevertheless, of the thorough studies are necessary to confirm these preliminary results.

Key words : Plants médicinales ; Area Sofia ; *Hydrostachys plumosa* ; Phytochimie ; Ethnopharmacologie ; Cytotoxicity.

RESUME

La majeure partie de la population malgache utilise les plantes pour se soigner. Elles sont certes, facilement disponibles et peu coûteuses mais les substances actives végétales sont le plus souvent, utilisées sous formes de mélanges complexes dont on ignore dans la majorité des cas les principes actifs et leurs mécanismes d'actions ainsi que leurs effets secondaires et éventuelles toxicités. C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'effectuer des études phytochimiques et ethnopharmacologiques de *l'Hydrostachys plumosa* (HYDROSTACHYACEAE), une plante médicinale aquatique qui est très utilisée en médecine traditionnelle dans la Région SOFIA. C'est une plante dont la décoction est utilisée pour atténuer la fatigue et traiter les maux de ventre et différentes pathologies liées à l'utérus ainsi que l'anorexie.

Dans une première étape, des criblages phytochimiques effectués sur *l'Hydrostachys plumosa* ont permis de démontrer que cette plante était essentiellement constituée des stéroïdes, les triterpenoïdes et les stérols insaturés.

Dans une seconde étape, des études pharmacologiques ont permis de démontrer d'une part, que l'extrait méthanolique de *l'Hydrostachys plumosa* ne présentait aucune activité antipaludique alors qu'elle exerceait une activité antihistaminique avec une valeur de CE_{50} de l'ordre de 1.125 mg/ml indiquant probablement, une activité antiasthmatique qui reste à étudier de manière plus approfondie. D'autre part, les différents extraits testés de *l'Hydrostachys plumosa* ont démontré une activité cytotoxique suffisante (CI_{50} moyenne = $17.5 \pm 3.7 \mu\text{g/ml}$) vis-à-vis des cellules cancéreuses P388 qu'elle pourrait être considérée comme une candidate potentielle dans la chimiothérapie anticancéreuse. Cependant, une telle application nécessiterait encore de nombreuses connaissances supplémentaires sur cette plante.

Cette étude apporte une meilleure connaissance sur la plante aquatique, *l'Hydrostachys plumosa*, permettant ainsi d'appréhender les problèmes liés à son utilisation en médecine traditionnelle. De plus, elle contribue à la valorisation de la biodiversité végétale de la Région SOFIA et par conséquent, de Madagascar. Néanmoins, des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires.

Mots clés : Plantes médicinales ; Région SOFIA ; *Hydrostachys plumosa* ; Phytochimie ; Ethnopharmacologie ; Cytotoxicité.