

Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 janvier 2022

Par

Jean-baptiste SEVESTRE

Né le 3 janvier 1993 à Limoges

**Recherche de méthode d'extraction et dosage qualitatif de
l'osladine à partir de rhizomes de *Polypodium interjectum* récoltés
en Limousin**

Thèse dirigée par Didier Froissard

Examineurs :

Mr Desmoulière Alexis, Professeur des Universités.....président du jury

Mr Froissard Didier, Maître de conférences des Universités.....Directeur de thèse

Mme Fons Françoise, Professeur des Universités.....juge

Mr Dartout Alexis, Docteur en Pharmacie diplômé d'Etat.....juge

Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 janvier 2022

Par Jean-baptiste SEVESTRE

Né le 3 janvier 1993 à Limoges

Recherche de méthode d'extraction et dosage qualitatif de l'osladine à partir de rhizomes de *Polypodium interjectum* récoltés en Limousin

Thèse dirigée par Didier Froissard

Examineurs :

Mr Desmoulière Alexis, Professeur des Universités.....président du jury

Mr Froissard Didier, Maître de conférences des Universités.....Directeur de thèse

Mme Fons Françoise, Professeur des Universités.....juge

Mr Dartout Alexis, Docteur en Pharmacie diplômé d'Etat.....juge



Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2021

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier (*) Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. JOST Jérémie Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

M. BASLY Jean-Philippe (*) Chimie analytique et bromatologie

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme COOK-MOREAU Jeanne Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DELEBASSÉE Sylvie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Elise (*) Pharmacologie

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. FROISSARD Didier Botanique et cryptogamie

Mme JAMBUT Anne-Catherine (*) Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland	Pharmacologie
M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

Mme AUDITEAU Émilie Épidémiologie, statistique, santé publique

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew Chargé de cours

Mme VERCELLIN Karen Professeur certifié

Remerciements

Aux membres de mon jury,

A mon président de jury, **Le professeur Alexis Desmoulière** pour me faire l'honneur de présider ce jury. Pour votre gentillesse, votre patience ainsi que vos conseils pendant toutes ces longues années d'études. Soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance.

A mon directeur de thèse, **Monsieur Didier Froissard** pour m'avoir accompagné tout au long de cette thèse, votre savoir et votre bienfaisance à mon égard. Cela a été un réel plaisir d'effectuer ce travail à vos côtés. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir guidé pendant ce travail.

A mes juges, **le professeur Françoise Fons** pour m'avoir accordé du temps pour juger ce travail ainsi que vos remarques toujours pertinentes. **Le docteur Alexis Dartout**, pour m'avoir accompagné dans la vie professionnelle. Même si ce n'était pas une période facile cela a toujours été un plaisir et un honneur de travailler à Ansac-sur-Vienne.

J'ai énormément appris à vos côtés, je m'en souviendrai toute ma vie, je vous remercie pour tout, recevez ma gratitude la plus sincère.

A mes collègues, anciens et actuels,

Je tenais à remercier tous mes collègues actuels **Pascale, Aurélie, Corinne** de la pharmacie d'Ansac-sur-Vienne pour leur bonne humeur, l'aide ainsi que toutes ces pauses café (pas trop fort le café) qui m'ont permis de tenir le coup pendant ces longues journées de vaccinations interminables.

A la pharmacie de Bosmie l'aiguille pour m'avoir fait découvrir le monde de la pharmacie déjà très jeune. **Aux docteurs Pierre Pasquet, Sophie Lambert et Camille Nony** pour m'avoir encadré à mes tous débuts de pharmacien en herbe. J'ai appris énormément de savoir à vos côtés. Merci aussi à **Martine J, Martin P, Claire, Nathalie, Karen** pour m'avoir épaulé pendant ces stages et surtout nourri.

A tous mes autres collègues que j'ai connu de près ou de loin, chaque expérience a été une pierre qui s'ajoutait à l'édifice.

A mes amis, ma famille,

A mes parents, **Hélène et Géraud**. Je ne sais pas par où commencer, merci pour l'éducation que vous m'avez donnée, merci pour tout l'amour que vous me témoignez à votre manière chaque jour de ma vie, merci d'avoir été indulgents et compréhensifs avec moi malgré les grosses frayeurs que j'ai pu vous faire. C'est grâce à vous que je suis devenu l'homme que vous voyez aujourd'hui, merci encore pour tout.

A ma sœur **Emmanuelle**, merci d'avoir été la grande sœur que chaque petit garçon rêve d'avoir. Je sais que j'ai tendance à garder les choses pour moi mais tu as été un phare dans ma vie depuis tout petit, tu m'as montré la voie à suivre. Même si je ne témoigne pas

mon affection de manière démonstrative, sache que je t'aime énormément, je serai toujours là comme tu as été là pour moi.

A ma marraine **Solange Pons**, depuis ma naissance tu m'as pris sous ton aile. Tu as été mon ange gardien et tu continues de me montrer le chemin à suivre. J'aurai aimé te garder plus longtemps à nos côtés, ta gentillesse et ta bienveillance me manquent. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as apporté. J'espère que de là où tu es, tu es fière de moi.

A tous les membres de ma famille proches comme éloignés, vous avez chacun contribué à votre manière à mes études et je vous en remercie.

A **Marie, Éric, Romain, Caroline, Adrien, Mégane** et **chouquette la plus belle**. C'est toujours un plaisir de partager des moments avec vous. Je vous considère comme ma Famille, merci d'être présents et m'avoir offert le plus beau cadeau de ma vie : **Caroline** ! je saurai m'en montrer digne.

A mes plus fidèles amis **Yann, Pierre, Pikou** et **Guillaume**. Nous avons marqué nos années fac d'une bière blanche. La légende raconte que notre amitié aurait été forgée en TP dans un Bain débordant de KMnO_4 , je préfère retenir que cette franche amitié est solide et qu'aucune tache (même violette) ne viendra l'abimer. Merci mes fratés pour tout !

A **Pascaline, Bianca, Laetitia, Jules** et tous ceux que je ne cite pas mais avec qui je partage toujours des moments inoubliables... dans la plupart des cas.

A **Milka** et **Klaus**, vous êtes les meilleurs.

Enfin, à Ma **Roly**, celle qui est présente tous les jours de ma vie, les plus sombres comme les plus heureux, qui me supporte malgré mes nombreuses boulettes et bêtises en tout genre. Ce jour où je suis arrivé en retard en TP de botanique a changé ma vie à jamais. Tu es ma meilleure amie, ma confidente, mon âme sœur, ce n'est que le début de notre belle aventure. Je me rends compte à quel point je suis chanceux d'avoir une personne aussi belle que toi à mes côtés. Caroline, je t'aime et cela ne s'arrêtera jamais.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction	12
I. Généralités sur les fougères.....	13
I.1. Classification.....	13
I.1.1. Le grade des ptéridophytes	13
I.1.2. Les Filicophytes par rapport aux autres fougères	16
I.1.3. Morphologie et anatomie d'une fougère.....	17
I.1.4. Reproduction sexuée chez les fougères	20
I.2. Histoire des fougères	22
I.2.1. Utilisation des fougères au cours du temps	22
I.2.2. Les fougères dans l'alimentation	23
I.3. La famille des Polypodiaceae.....	25
I.3.1. Le genre <i>Polypodium</i>	27
I.3.2. Les principales molécules présentes chez les polypodes	30
I.3.3. L'osladine	31
II. Expérimentations sur les fougères du Limousin.....	35
II.1.1. Récolte des échantillons et Recherche de la méthode d'extraction de l'osladine, méthode de J. REISCH et A.M DAWIDAR	35
II.1.2. Extraction selon la méthode de J. REISCH et A.M DAWIDAR.....	36
II.1.3. Adaptation et expérimentation de la méthode de J. REISCH et A.M DAWIDAR ..	39
II.2. Recherche de la méthode d'extraction de l'osladine, méthode de A. SIMON et al	41
II.2.1. Extraction selon la méthode de A. SIMON et al	41
II.2.2. Adaptation et expérimentation de la méthode de A. SIMON et al.	43
II.3. Expérimentations sur <i>Polypodium interjectum</i> du Limousin.....	45
II.3.1. Comparaison des résultats des deux méthodes	45
III. Discussion.....	50
Conclusion	52
Références bibliographiques	53
Serment De Galien.....	55

Table des illustrations

Figure 1 : Classification des eucaryotes	13
Figure 2 : <i>Psilotum nudum</i>	14
Figure 3 : <i>Lycopodium alpinum</i>	14
Figure 4 : <i>Equisetum arvense</i>	15
Figure 5 : <i>Pteridium aquilinum</i>	15
Figure 6 : Classification PPG I (2016) des ptéridophytes.....	16
Figure 7 : Schéma de l'aspect général d'une fougère	17
Figure 8 : espèce traçante, le Polypode commun	18
Figure 9 : espèce en touffe, Fougère plume d'autruche.....	18
Figure 10 : Schéma des différents organes d'une feuille de fougère (4)	19
Figure 11 : Coupe transversale de rhizome de polypode.....	19
Figure 12 : reproduction sexuée chez les Filicophytes.....	21
Figure 13 : eusporange et leptosporange, coupes longitudinales (5).....	22
Figure 14 : Gosari namul, plat traditionnel coréen à base de pousse de Fougère aigle	24
Figure 15 : classification phylogénétique APG III.....	25
Figure 16 : le Polypode commun, anatomie et organisation des sporanges (10)	26
Figure 17 : Planche botanique de Polypodiaceae.....	27
Figure 18 : <i>Polypodium interjectum</i> , descendant de <i>Polypodium cambricum</i> et <i>Polypodium vulgare</i> d'après le poster « Caractères morphologiques des différents taxons de Polypodes de France métropolitaine, Froissard D, Fons F, Boudrie M, Chabrol L, Rapior S ».....	29
Figure 19 : structure de l'osladine.....	32
Figure 20 : trois différents lieux de récoltes de <i>Polypodium interjectum</i> : un rocher, une racine d'arbre et un sol couvert de mousse.....	35
Figure 21 : Rhizomes secs et épluchés de <i>Polypodium interjectum</i> avant la mise en poudre	36
Figure 22 : poudre de rhizomes dans l'éthanol aqueux avant agitation.....	39
Figure 23 : extraction liquide/liquide avec l'acétate d'éthyle.....	40
Figure 24 : évaporation de la phase butanol pour obtenir un extrait sec	40
Figure 25 : solution après agitation barreau aimanté (méthanol et poudre de rhizome)	43
Figure 26 : évaporation rotative de la solution méthanol/poudre de rhizome	44
Figure 27 : acétone faisant précipiter la solution.....	44
Figure 28 : extraction liquide/liquide de la solution méthanol aqueux à l'hexane.....	45
Figure 29 : une plaque de chromatographie de chaque méthode en migration dans la phase butanol/acide acétique/eau distillée	46

Figure 30 : Chromatographie selon la méthode de Reisch, extrait final à droite dans phase butanol/acide acétique/eau distillée révélé à l'acide sulfurique 5%	47
Figure 31 : à gauche, phase cyclohexane/acétate d'éthyle, à droite phase butanol/acide acétique/eau distillée. Réactif ANS 5%.....	47
Figure 32 : résultats des deux méthodes d'extractions dans phase mobile butanol/acide acétique/eau distillée. A gauche et au milieu réactif ANS 5%, à droite le « référent » acide sulfurique à 50%.....	48
Figure 33 : Chromatographie et rapports frontaux de l'expérience de Reisch.....	49

Introduction

Le Limousin est une région avec une flore riche et abondante. On y trouve de nombreux conifères, feuillus, fleurs et plantes en tout genre. Cependant, on a souvent tendance à oublier les fougères, ces plantes préhistoriques à l'apparence simple mais qui n'en sont pas moins complexes. De nombreuses familles de fougères sont implantées en Limousin. En effet, les bois et sous-bois présents dans la région offrent un biotope idéal. Le climat tempéré, les nombreux cours d'eau et nappes phréatiques ainsi que le sol sont propices à la prolifération de ces plantes cryptogames.

C'est au cours de mes balades dans les bois que mon intérêt pour la fougère s'est développé. Voir un champ de Fougère aigle s'étendre, puis apercevoir plus loin sur le chemin escarpé une touffe de fougère plume d'autruche, et enfin s'asseoir sur une souche d'arbre où des polypodes communs ont élu domicile. On les considère souvent à tort comme des végétaux envahissants, qu'elles ne sont pas très utiles voire toxiques. En effet, on a souvent peur de ce qu'on ne connaît pas très bien, ce qui est le cas des fougères.

A travers cette thèse, j'ai voulu partager mon intérêt pour cette plante mal aimée, la découvrir et la redécouvrir à travers aussi bien un aspect pratique que théorique. C'est pourquoi j'ai voulu effectuer mon travail de fin d'études sur un souvenir d'enfance, le goût sucré du polypode, la réglisse des pauvres. Pourquoi ce qu'on appelle vulgairement « la racine » de cette fougère est-elle sucrée ? Est-ce que des facteurs peuvent influencer cette « concentration » en sucre, comme la saison, le support sur lequel elles poussent ou encore l'exposition au soleil ?

Dans un premier temps, nous allons nous pencher sur les généralités des fougères puis nous creuserons un peu plus en profondeur sur la famille des Polypodiaceae et particulièrement *Polypodium interjectum*. Nous allons voir leurs caractéristiques, méthode de reproduction ainsi que les molécules que contiennent ces plantes et en particulier l'osladine.

Ensuite nous comparerons deux méthodes d'extractions afin de savoir laquelle serait la plus facile à reproduire. Ces méthodes ne seront en aucun cas un moyen d'obtenir quantitativement de l'osladine mais qualitativement.

Pour conclure nous débattrons de l'utilisation de ces méthodes ainsi que de leur faisabilité et pertinence.

I. Généralités sur les fougères

I.1. Classification

I.1.1. Le grade des ptéridophytes

Les ptéridophytes constituent un groupe intermédiaire dans l'embranchement des végétaux. Ils composent un grade, cela signifie que c'est un groupe d'organismes vivants qui partagent des traits communs avec un groupe phylogénétique voisin. Elles se démarquent des Bryophytes en privilégiant le génome diploïde plutôt qu'haploïde. De plus, les ptéridophytes se différencient par leurs organes sexuels cachés à l'inverse des Spermatophytes qui vont présenter des fleurs et des graines. Les ptéridophytes sont une sous-division de Cryptogames vasculaires et constituent une évolution majeure dans le règne des plantes.

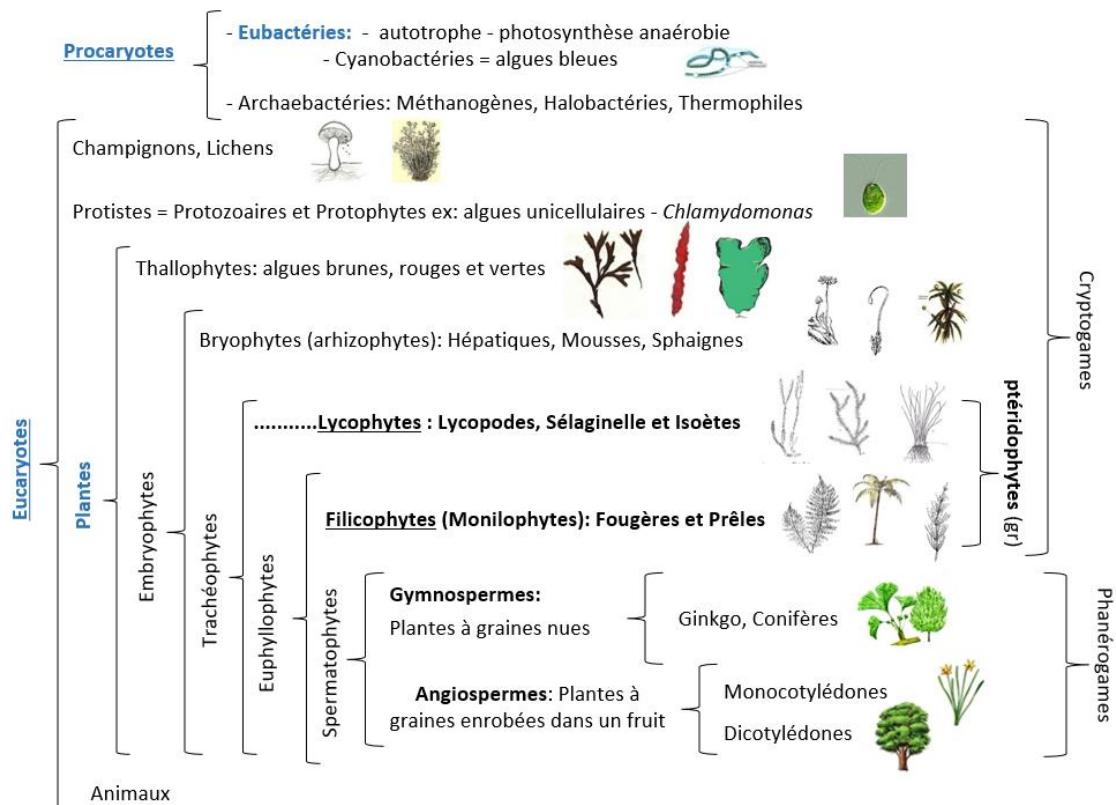


Figure 1 : Classification des eucaryotes

En effet, les ptéridophytes sont caractérisés par l'apparition d'une vascularisation et d'un nouvel organe, la racine. Par la suite, la régression de la phase gamétophytique se limite à un prothalle qui permet le développement d'un véritable embryon à partir duquel vont pouvoir s'édifier les tiges feuillées du sporophyte.

Ce groupe est très ancien, en effet des fossiles de ptéridophytes datant de l'ère du Dévonien, c'est à dire environ 400 millions d'années avant notre ère ont été retrouvés. L'Age

d'Or des ptéridophytes se situe pendant le carbonifère (environ 300 millions d'années avant notre ère). Particulièrement bien adaptés pour la vie terrestre, on retrouve des spécimens arborescents de plus de 4 mètres de haut créant ainsi de vastes forêts dont la fossilisation est aujourd'hui à l'origine de gisements de pétrole, de gaz et de charbon. Cet Age d'or va se terminer au Permien (environ 200 millions d'années avant notre ère) car de nouvelles espèces de végétaux, plus performantes vont prendre leur place.

L'embranchement des ptéridophytes se divise en quatre classes distinctes (1) :

- Les Psilophytes ou Psilophytinées sont certainement les plus primitives et donc les plus anciennes. Leurs feuilles sont très réduites ; elles ne présentent que des microphylls qui sont des feuilles archaïques ne contenant qu'un vaisseau conducteur. Elles sont dépourvues de racines. Il ne reste aujourd'hui que trois espèces appartenant aux genres *Psilotum* (Figure 2 : *Psilotum nudum*) et *Tmesipteris* vivant dans les régions tropicales. Ce sont des plantes épiphytes formées uniquement d'axes ramifiés de façon dichotomique.



Figure 2 : *Psilotum nudum*

- Les Lycophytes ou Lycopodinées sont une classe restreinte comptant environ 850 espèces réparties en plusieurs genres dont *Selaginella*, *Lycopodium* (Figure 3 : *Lycopodium alpinum*) et *Isoetes* qui sont pratiquement toutes herbacées. Ce sont des plantes différenciées en racines, tiges et feuilles.



Figure 3 : *Lycopodium alpinum*

- Les Sphénophytes ou articulées sont caractérisés, comme leur nom l'indique, par un appareil végétatif articulé formé d'articles successifs portant à chaque nœud un verticille de feuilles réduites. Au Paléozoïque il existait des formes arborescentes comme les calamites aujourd'hui disparues. Aujourd'hui il ne reste qu'une trentaine d'espèces appartenant au genre *Equisetum* qui sont des plantes herbacées : les prêles (Figure 4 : *Equisetum arvense*).



Figure 4 : *Equisetum arvense*

- Les Filicophytes ou Filicinées sont les fougères pour la plupart herbacées. Contrairement aux classes précédentes, les Filicophytes (Figure 5 : *Pteridium aquilinum*) présentent des feuilles de grande taille. Quelques familles arrivées au terme de leur évolution existent aujourd'hui sous forme herbacée mais n'ont rien à voir avec leurs ancêtres arborescents. Cependant il subsiste encore des espèces tropicales arborescentes. C'est la classe de ptéridophyte la plus importante comptant plus de 13 000 espèces. Intéressons-nous de plus près à cette sous-division (2).



Figure 5 : *Pteridium aquilinum*

I.1.2. Les Filicophytes par rapport aux autres fougères

Une nouvelle classification (Figure 6 : Classification PPG I (2016) des ptéridophytes) récente de 2016, la PPG I (Pteridophyte Phylogeny Group) permet de montrer la diversité des Filicophytes par rapport aux trois autres classes (1).

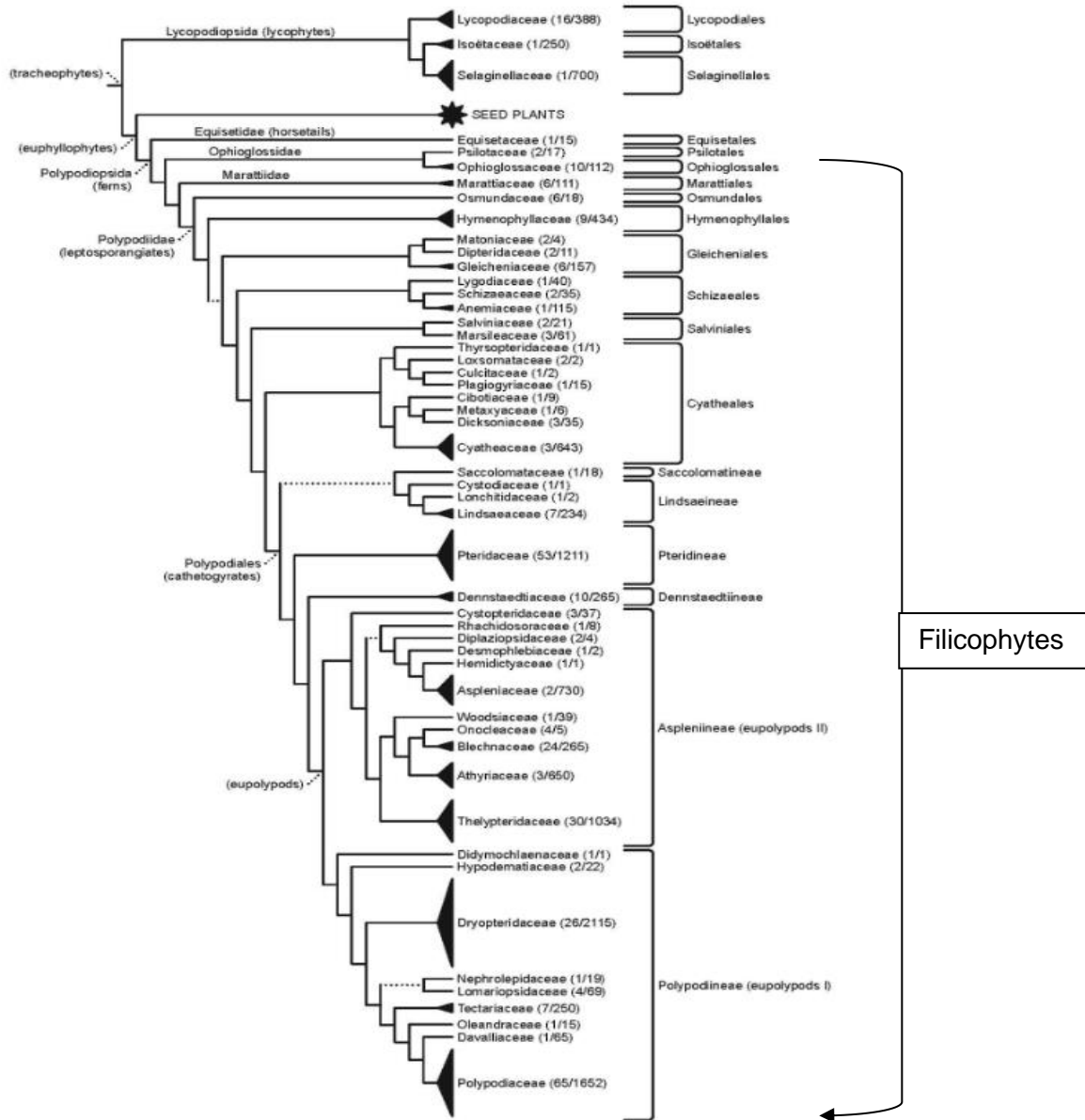


Figure 6 : Classification PPG I (2016) des ptéridophytes

Cette figure nous montre ainsi la grande diversité des Filicophytes. Et parmi cette sous-division, le polypode auquel nous nous intéressons dans ce travail.

I.1.3. Morphologie et anatomie d'une fougère

Une fougère est composée de plusieurs organes (Figure 7 : Schéma de l'aspect général d'une fougère) ; le limbe, le pétiole et le rhizome. Chaque partie est unique et assure une fonction bien précise.

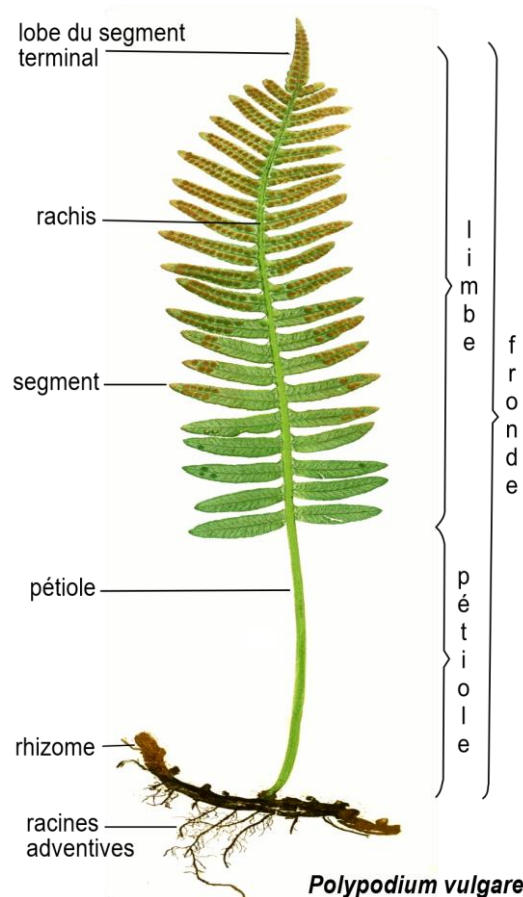


Figure 7 : Schéma de l'aspect général d'une fougère

Il existe une grande diversité de feuilles chez les ptéridophytes. Elles sont souvent de grande taille pour les Filicophytes, solitaires pour les espèces traçantes (Figure 8 : espèce traçante, le Polypode commun) ou en rosette à l'extrémité du rhizome pour les espèces en touffe (Figure 9 : espèce en touffe, Fougère plume d'autruche), et représentent la seule partie visible de la plante. On les nomme frondes et sont issues d'un rhizome souterrain. La fronde se compose du pétiole et du limbe, la plupart du temps la feuille est pennée. Lorsque les frondes sont jeunes, elles sont dites « en crosse » à cause de leur aspect qui se rapproche de la crosse d'un évêque. Leur développement dans le bourgeon souterrain est lent. Par exemple, chez la fougère mâle toutes les cellules d'une feuille qui sortira de terre au printemps sont déjà formées, il ne leur reste plus qu'à grandir et s'allonger. Ceci explique la croissance rapide des frondes (3).



Figure 8 : espèce traçante, le Polypode commun



Figure 9 : espèce en touffe, Fougère plume d'autruche

La structure anatomique (Figure 10 : Schéma des différents organes d'une feuille de fougère) des feuilles est complexe on peut apercevoir certains tissus tels que l'épiderme, le parenchyme palissadique est constitué de cellules allongées riches en chloroplaste ainsi que le parenchyme lacuneux à la face inférieure de la feuille avec ses stomates permettant une régulation des échanges gazeux. La fougère utilise ses racines pour pomper dans le sol l'eau et les sels minéraux nécessaires à son développement.

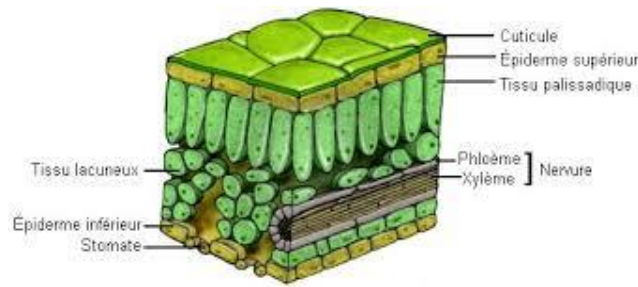


Figure 10 : Schéma des différents organes d'une feuille de fougère (4)

Les fougères sont dites Cormophytes, c'est-à-dire qu'elles présentent une tige qui est ici souterraine : le rhizome. Ce rhizome a différents rôles, il sert à ancrer la fougère dans le sol mais aussi à véhiculer la nourriture puisée dans le sol par des racines. Il achemine la nourriture via un réseau de tissus conducteurs (Figure 11 : Coupe transversale de rhizome de polypode) dans tout l'appareil végétatif. Ce réseau est composé du xylème, il achemine la sève brute à l'aide de vaisseaux que l'on appelle trachéïdes scalariformes. Un autre tissu sert à conduire la sève élaborée riche en substance organique : le phloème. L'ensemble de ces deux tissus forme la stèle. L'agencement de ces tissus est d'un réel intérêt et permet de mieux distinguer les groupes de ptéridophytes.

Schémas en figurés conventionnels

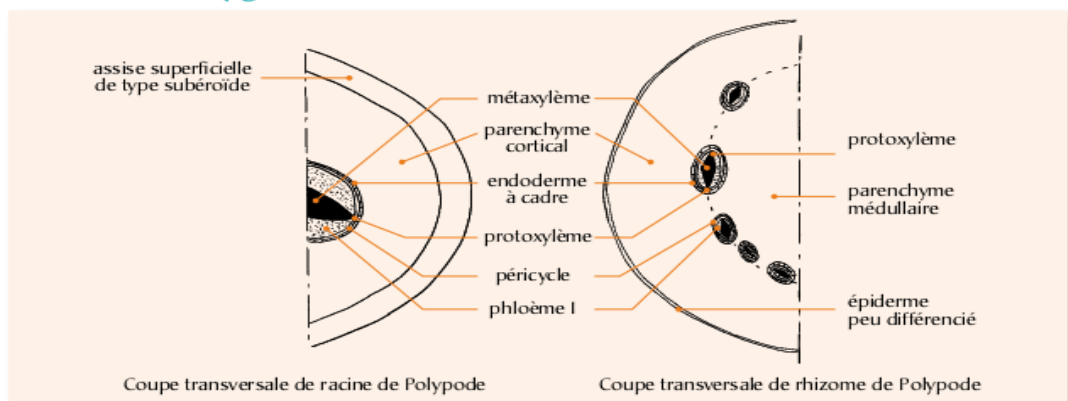


Figure 11 : Coupe transversale de rhizome de polypode

En France, la plupart des fougères a une tige à croissance horizontale, souterraine ou rampante en surface permettant à la plante de pousser sur n'importe quel support. La croissance de ce rhizome est assurée par une seule cellule apicale qui se divise continuellement, à l'inverse des Spermatophytes qui disposent d'un groupe de cellules nommé méristème. Les racines se forment ainsi latéralement sur ce rhizome. Ce rhizome peut être à l'origine de reproduction asexuée chez certaines espèces comme la Fougère aigle, fougère très toxique et à l'origine de nombreuses croyances.

I.1.4. Reproduction sexuée chez les fougères

Les spores sont formées au sein d'un sporange différencié. Le cycle de la fougère (Figure 12 : reproduction sexuée chez les Filicophytes) se déroule en deux phases bien distinctes. Étant donné que c'est une reproduction sexuée, la fusion de deux gamètes de sexe opposé conduit à la formation d'un œuf ou plus précisément un zygote. Ces gamètes sont produits et contenus dans des organes particuliers : les gamétanges. Ces gamétanges sont eux-mêmes différenciés en gamétange mâle que l'on appelle anthéridie, et en gamétange femelle que l'on appelle archégone. Les individus différenciés qui portent les gamétanges sont les gamétophytes. Le nombre de chromosomes contenus dans leurs cellules est réduit (n), les gamètes sont des cellules haploïdes. Les gamétophytes forment donc la phase haploïde du cycle de reproduction ou haplophase. La fusion de deux gamètes engendre la formation d'un œuf diploïde. Cet œuf va être à l'origine du sporophyte qui va être la forme que l'on va observer dans la nature. C'est le début de la phase diploïde du cycle ou diplophase.

Le sporophyte va différencier différents organes dont les sporanges. Ces sporanges sont situés le plus souvent sur la face inférieure de la fronde (mais pas chez les Prêles). Ces sporanges regroupés constituent des sores, qui peuvent être nus ou protégés par un voile nommé indusie. Au sein de ces sporanges des cellules diploïdes subissent une réduction chromatique ou méiose. Cette division cellulaire va engendrer la formation de spores. En effet la méiose d'une cellule diploïde entraîne la formation de quatre cellules haploïdes. Lorsque la spore germe, elle donne naissance à un nouvel individu haploïde : le gamétophyte qui est représenté chez la fougère par le prothalle qui a une durée de vie courte. Ces deux phases vont se répéter indéfiniment. Ce phénomène s'appelle l'alternance des générations.

Chez les Filicophytes, le prothalle est une lame peu épaisse verte en forme de cœur qui est ancrée au sol par des filaments fins ou rhizoïdes. Les gamétanges mâles sont formés au niveau de la zone des rhizoïdes tandis que les gamétanges femelles, reconnaissables à leur col formé d'un empilement de cellules, sont localisées près de l'échancrure. À maturité, les nombreux gamètes mâles ciliés ou anthérozoïdes sont libérés via une déchirure de la paroi de l'anthéridie et nagent jusqu'à pénétrer dans le col d'un archégone. Ils sont ainsi attirés par chimiotactisme pour aller fusionner avec le gamète femelle unique, l'oosphère et former ainsi le zygote. L'embryon formé se développera pour former une petite plantule qui grandira en sporophyte.

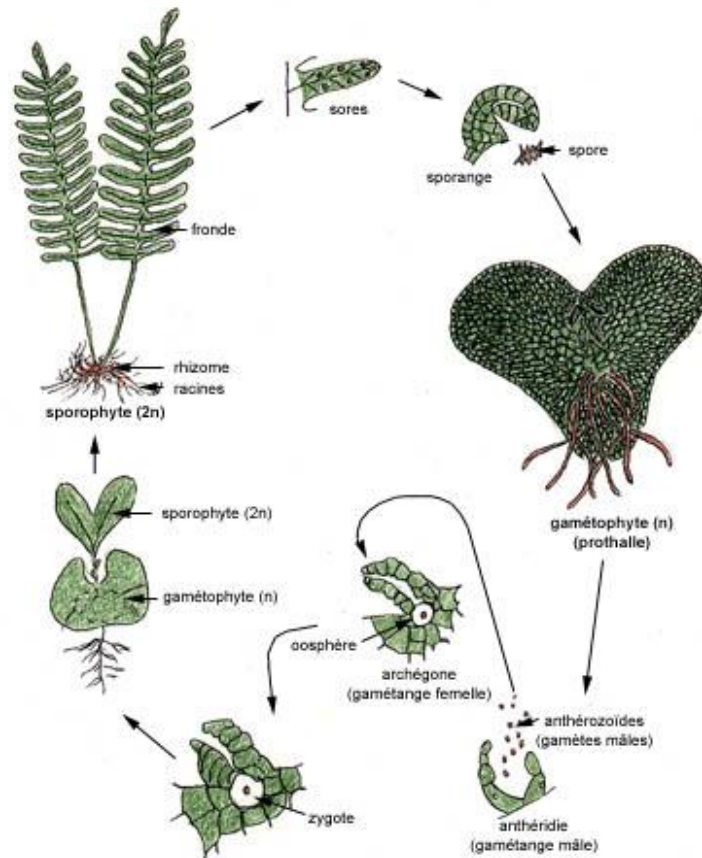


Figure 12 : reproduction sexuée chez les Filicophytes

On distingue 2 types de sporanges : la forme des sorts et la disposition des sporanges sont très importantes, c'est sur l'ensemble de ces caractères que l'on se fonde pour établir la classification des fougères. On peut distinguer ainsi deux types de sporanges (Figure 13 : eusporange et leptosporange, coupes longitudinales (5)) :

- Les Eusporanges, caractérisés par une enveloppe composée de plusieurs assises de cellules protectrices pour le sporange. Deux familles en particulier sont retrouvées chez les eusporangiés, les Marattiacées dont le sporange est dépourvu d'anneau, et les Ophioglossacées qui présentent une préfoliation non circinées et des sporanges soudés.
- Les Leptosporanges, caractérisés par la présence d'une seule assise de cellules protégeant le sporange. Les fougères, majoritairement représentées aujourd'hui par l'ordre des Polypodiales, sont des leptosporangiées.

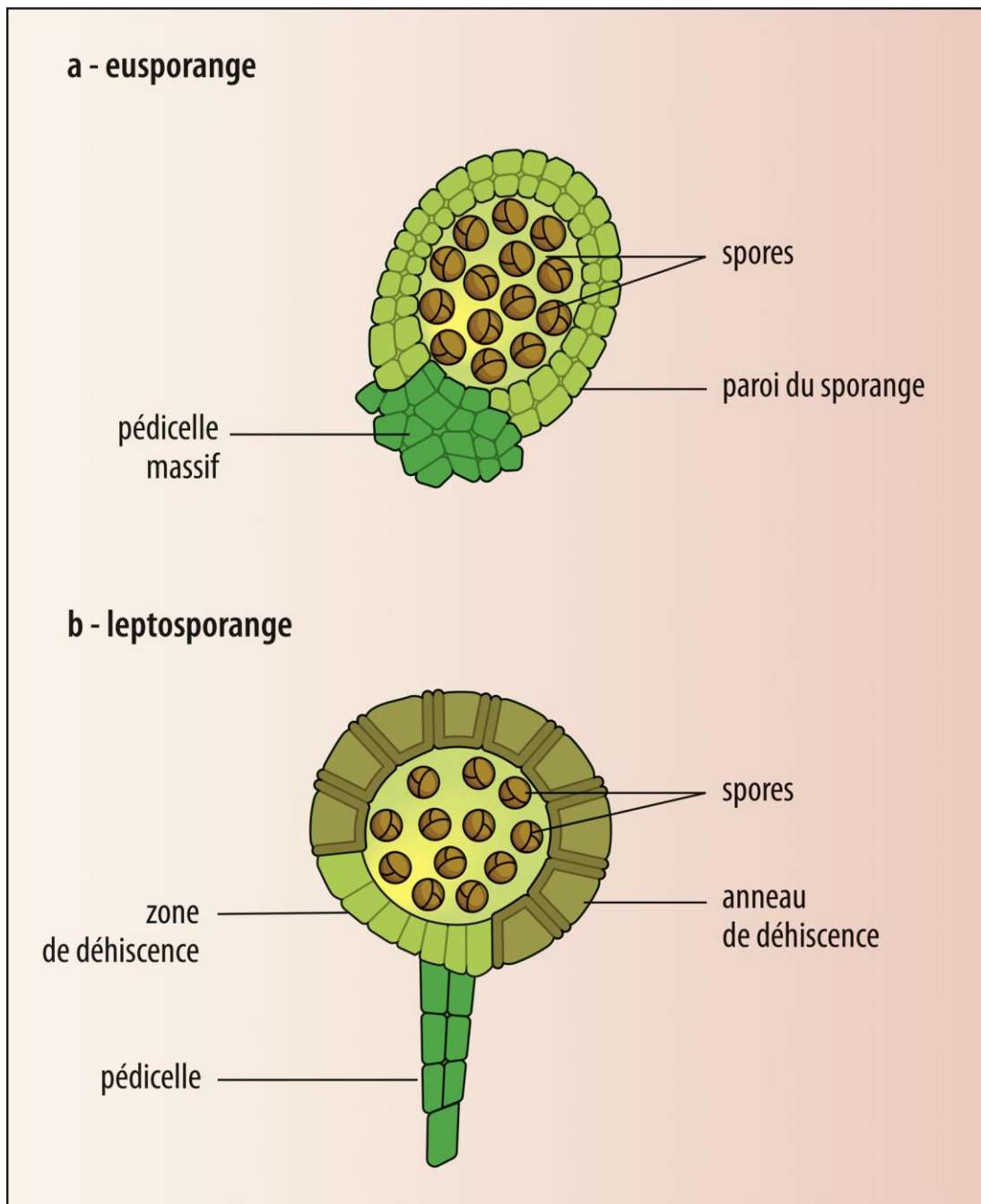


Figure 13 : eusporange et leptosporange, coupes longitudinales (5)

I.2. Histoire des fougères

I.2.1. Utilisation des fougères au cours du temps

Les fougères sont présentes sur la quasi-globalité du globe. Par conséquent on les retrouve souvent dans le folklore de beaucoup de régions telles que l'Europe, l'Amérique et l'Asie.

On retrouve les premières utilisations des fougères chez les Grecs. En effet, Discoride médecin grec du 1^{er} siècle répertorie plantes, animaux et minéraux dans son ouvrage *De Materia Medica*. Il écrit à propos de la Fougère mâle que le rhizome présente des propriétés vermifuges et plus précisément ténifuges. En effet il associe le rhizome de Fougère mâle à de la Scammonée et de l'Hellébore noire, deux puissants purgatifs. La Fougère mâle servait à tuer le ver, la Scammonée et l'Hellébore noire servaient à évacuer le ver déjà mort. Cependant Discoride explique aussi que cette plante est abortive, il l'explique par ces termes : « si une femme l'emploie elle ne concevra pas, si elle marche dessus, elle avortera ». Cette croyance est due au fait que le fœtus était considéré dans l'antiquité comme un parasite et donc assimilé au ver solitaire. De plus plusieurs plantes reconnues comme vermifuges sont réellement abortives, nous pouvons citer la tanaisie, l'armoise, l'absinthe...

Certaines fougères étaient utilisées par les druides pour concocter toute sorte de remèdes. Une légende celte raconte qu'effleurer une fougère poussant au-dessus d'un ruisseau fréquenté par des fées guérirait les affections cutanées.

Une autre croyance chez les slaves raconte que lors de la nuit de la Saint Jean une fleur de fougère pousse. Celui qui arriverait à la trouver et à la cueillir obtiendrait des pouvoirs magiques et bonne fortune. L'endroit où pousse cette fleur de fougère marquerait aussi l'emplacement d'un trésor.

Au XVII^e siècle, les Amérindiens faisaient du commerce de fougères aux propriétés curatives avec les Français. Les Indiens trempaient des racines de polypode dans du lait pour l'utiliser comme laxatif pour les enfants. Ils utilisaient aussi les racines de cette plante en thé dans de nombreuses indications(6).

Il faudra attendre 1845 en Grande Bretagne pour la publication d'un ouvrage qui suscitera à nouveau l'intérêt : *A catalogue of British Ferns* (7). Cet ouvrage répertorie les espèces natives de Grande Bretagne ainsi que les localités où elles ont été trouvées. Ce regain d'intérêt pour les fougères vient du fait que les fougères jusqu'à présent avaient été peu étudiées.

De nos jours, les fougères restent un symbole chez de nombreux peuples. La Fougère argentée *Cyathea dealbata* est un symbole fort de la Nouvelle-Zélande. En effet elle est présente sur le maillot des joueurs de rugby néo-zélandais, de plus une proposition de drapeau figurant la Fougère argentée est en cours d'étude par le gouvernement Néo-Zélandais.

I.2.2. Les fougères dans l'alimentation

On retrouve l'utilisation de quelques fougères dans la cuisine dans certains pays. En Europe et aux Etats Unis seulement quelques fougères sont consommées. Notamment la Fougère autruche *Matteuccia struthiopteris* ou plus rarement la Fougère aigle. Cependant une grande vigilance est de mise lorsqu'on cueille et cuisine des fougères, comme toute autres plante ou champignon. En Asie mais surtout dans la région du Pacifique, les jeunes pousses de la fougère *Cyathea medullaris* sont encore utilisées en tant qu'aliment. Cette fougère bouillie dans du lait de coco ou de l'eau est souvent cuisinée pour les fêtes traditionnelles. Quelques espèces sont utilisées dans la cuisine. Les cuisiniers coréens préparent un plat typique à base de pousses de Fougère aigle sautées, d'ail émincé et de sauce soja : le gosari namul (Figure 14 : Gosari namul, plat traditionnel coréen à base de pousse de Fougère aigle). Cette fougère étant toxique crue, elle est au préalable préparée notamment bouillie pour éliminer les substances les plus toxiques (8).



Figure 14 : Gosari namul, plat traditionnel coréen à base de pousse de Fougère aigle

En effet, les jeunes pousses de Fougères aigle que l'on appelle crosse ainsi que les têtes de violon (*Matteuccia struthiopteris*) par leur forme sont parfois consommées. Cependant, les crosses de Fougères aigle contiennent des substances carcinogènes comme le ptaquiloside. Plus la plante vieillit et plus ces substances sont présentes c'est pourquoi il ne faut manger que les jeunes pousses. Entre autres les Japonais, qui consomment cette fougère, ont aussi l'un des plus hauts taux incidences de cancer de l'estomac du monde.

A la fin du XVII -ème siècle en Auvergne il y avait de nombreuses famines à cause des intempéries et des températures très froides qui gelaient les cultures. Marcel Coquillat (1897-1966), Président d'honneur et ancien secrétaire général de la société Linnéenne de Lyon écrit dans un article paru en 1950 à propos du « pain de fougère » :

« En conclusion, il est donc certain que furent utilisées avec efficacité, au moins les tiges souterraines ou rhizomes de la Fougère aigle et de la Fougère mâle, vraisemblablement séchés et pilés, quelquefois moulus, et mélangés si possible à d'autres produits tels que : son, farine de seigle, farine d'orge, etc..., pour la fabrication du pain de fougère, consommé en période de disette, à défaut d'un meilleur aliment. »(9)

Plus tard, au début du XVIII -ème siècle en Europe, lorsque le thé venait à manquer, on utilisait des fougères mâles sèches pour en faire une infusion pour remplacer le thé. On utilisait aussi du sirop de capillaire pour remplacer le sucre dans des infusions de thé. Ces boissons étaient appelées « bavaoises », elles pouvaient être agrémentées de lait, de café, de chocolat ainsi que de rhum.

Dans un autre domaine, la Capillaire de Montpellier était utilisée en infusions, décoctions, extraits secs... Le sirop simple était utilisé comme édulcorant mais aussi pour les toux et les affections de la gorge grâce à ses propriétés expectorantes, antitussives et adoucissantes. La teinture était utilisée pour fortifier les cheveux. En effet, le deuxième nom de cette fougère est « cheveux de vénus ». Selon la théorie des signatures, on a donc utilisé la capillaire pour faire pousser les cheveux, les renforcer ou les rendre plus brillants.

De nos jours en France, les fougères sont assez peu utilisées en cuisine mais cette tendance tend à se démocratiser avec de nouvelles formes de consommation de la pousse de Fougère aigle notamment en dessert ou en glace. En effet, certaines fougères présentent un rhizome sucré. La racine du polypode est utilisée pour sa douceur et son goût très sucré qui rappelle celui de la réglisse, d'où son nom réglisse des bois. Cette propriété est due à une molécule, l'osladine qui présente un pouvoir 500 fois plus sucrant que le sucre lui-même. Il est courant de la retrouver dans la cuisine traditionnelle et la pâtisserie moderne ainsi que dans la confiserie tel que les nougats. On peut aussi consommer le rhizome directement en le

mâchant. C'est cette fougère de la famille des Polypodiaceae à laquelle nous allons nous intéresser dans cette thèse.

I.3. La famille des Polypodiaceae

Selon la classification phylogénétique APG III (Figure 15 : classification phylogénétique APG III) nous pouvons situer le genre polypode selon la manière suivante :

Classification phylogénétique APG III

Règne	Archéplastides
Clade	Chlorobiontes
Clade	Trachéophytes
Clade	Monilophytes
Clade	Filicophytes
Clade	Leptosporangiées
Ordre	Polypodiales
Famille	Polypodiacées
Sous-famille	Polypodioïdées
Genre	<i>Polypodium</i>

Figure 15 : classification phylogénétique APG III

Les polypodes font partie de la famille des Polypodiaceae qui est une famille de plantes qui vivent dans des climats humides, tempérés et ombragés. La famille des Polypodiaceae est intégrée dans l'ordre des Polypodiales et dans la classe des Filicopsida qui fait partie de la division des ptéridophytes. Les plantes de cette famille sont nombreuses et variées, il en existe plus de 1000 espèces qui sont regroupées en 50 genres. Le genre *Polypodium* reste le genre le plus représentatif de cette famille. Cette famille est très diversifiée, elle compte de nombreuses tribus, sous-familles et genres. Presque toutes sont épiphytes mais certaines sont terrestres et quelques exceptions sont aquatiques.

Majoritairement les frondes des Polypodiacées ne sont pas grandes, érigées sur un rhizome rampant squameux couvert d'écailles avec de nombreuses ramifications (Figure 16 : le Polypode commun, anatomie et organisation des sporanges (10)). Les frondes sont entières à pennatiséquées mais peuvent être aussi fourchues. Les feuilles sont nervurées avec des pétioles qui sont dénués d'écailles. Les spores se situent à la face inférieure des feuilles, rarement sur les bords et sont dépourvues d'indusies.

Polypode (*Polypodium vulgare*)

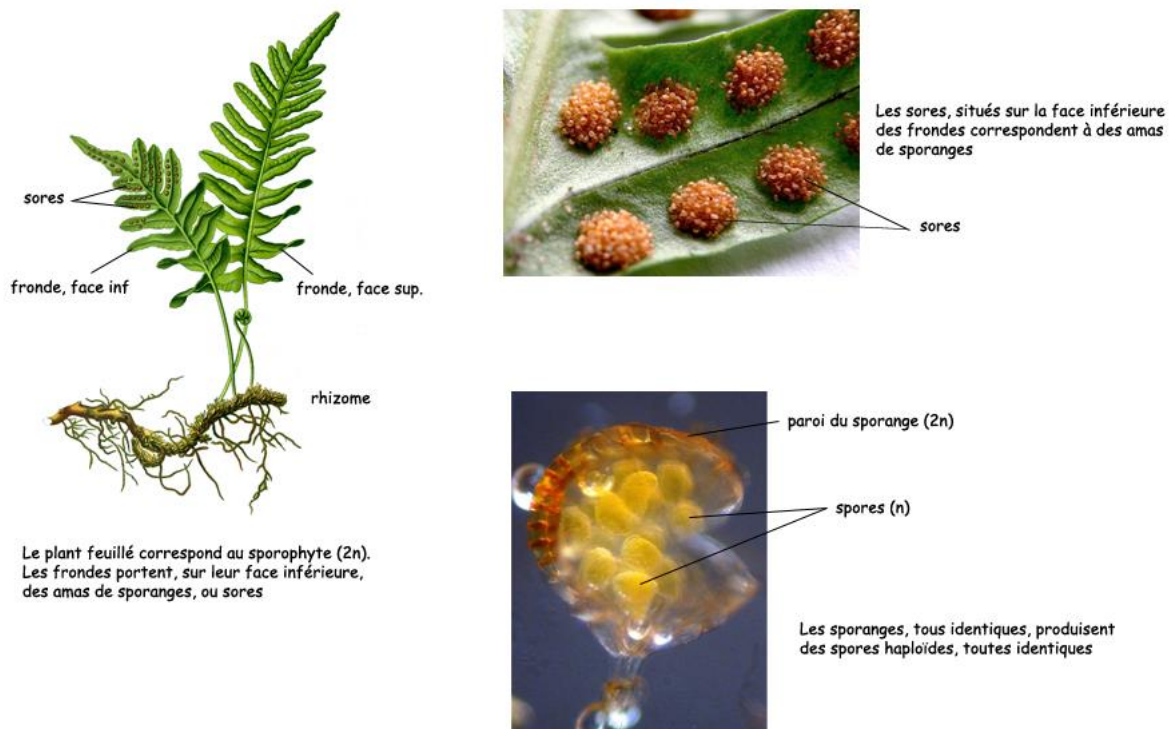


Figure 16 : le Polypode commun, anatomie et organisation des sporanges (10)

Sur la Figure 16 : le Polypode commun, anatomie et organisation des sporanges (10), on peut apercevoir les sores. Ce sont des amas de sporanges composés de spores haploïdes. La dessiccation de l'anneau de déhiscence, comme son nom l'indique, permet l'ouverture du sporange et donc la libération des spores.

Ces plantes peuvent être utilisées dans le domaine médical, en médecine traditionnelle ainsi qu'en médecine moderne. Par exemple le *Polypodium leucotomos* est utilisé dans la composition de soin solaire protecteur anti UV grâce à ses propriétés anti oxydantes, protectrices et réparatrices des gènes mutés liés aux UV. Un autre polypode, *Polypodium vulgare* était autrefois utilisé pour aromatiser les feuilles de tabac, ce qui leur donnait un petit goût de réglisse. Ce même polypode est utilisé à l'île de Pantelleria en Sicile pour nourrir les vaches, ce qui augmenterait les rendements de lait. Il était aussi utilisé sous le nom de *Catholicum simple* dans la pharmacopée maritime occidentale au XVIII -ème siècle où il était considéré comme un médicament de la famille des électuaires et utilisé comme purgatif(11).

I.3.1. Le genre *Polypodium*

Le nom du polypode vient du grecque *polus* signifiant « nombreux » et *podion* signifiant « petit pied ». Elle tient son nom de son rhizome qui présente de nombreuses racines et appendices.

Ces plantes peuvent être épiphytes, elles prennent appui sur d'autres plantes sans en extraire de nourriture mais aussi saxicoles c'est à dire qu'elles poussent sur les rochers ou les murets ou encore terricole : elles poussent sur le sol. On les retrouve en climat méditerranéen, tempéré et montagnard. Les polypodes sont présents en Europe ainsi qu'au Canada et sur la côte ouest des Etats-Unis. On peut rencontrer cette fougère aussi dans des endroits humides, le long d'un ruisseau, en forêt ou encore en montagne jusqu'à environ 2 000 mètres d'altitude (2).

Ces fougères sont vivaces et mesurent une trentaine de centimètres de haut. Elles présentent un feuillage persistant avec des feuilles légèrement épaisses à pétioles longs et dénudés, comme on peut le voir sur la Figure 17 : Planche botanique de Polypodiaceae. De plus ces feuilles sont oblongues lancéolées pennatipartites. Elles peuvent présenter jusqu'à 25 paires de segments lancéolés alternés, confluent à la base et peuvent être parfois dentées.



Figure 17 : Planche botanique de Polypodiaceae

Les sores diffèrent selon les différentes espèces de polypodes. En effet, les trois espèces françaises se ressemblent énormément : le Polypode commun (*Polypodium vulgare*), le Polypode du pays de Galles (*Polypodium cambricum*) et le Polypode intermédiaire (*Polypodium interjectum*) qui est un hybride des deux précédents. Le génome de *Polypodium interjectum* est allohexaploïde. Il est formé de l'association du génome diploïde de *Polypodium cambricum* et du génome allotétraploïde de *Polypodium vulgare*.

Polypodium cambricum est le plus adapté de ces trois polypodes au climat chaud. On le rencontre en région méditerranéenne ainsi que sur le sud de la côte atlantique et la région pyrénéenne. Ses feuilles peuvent mesurer 15 à 30 centimètres de long et sont espacées le long d'un rhizome traçant. La particularité du limbe de ses feuilles est sa largeur : il est large à la base puis se réduit en une longue pointe au sommet et ses pennes sont dentées sur leur bordure. L'une de ses caractéristiques qui le distingue de *Polypodium interjectum* et *Polypodium vulgare* est qu'il présente des poils pluricellulaires ramifiés parmi les sporanges dans les sores : les paraphyses. C'est une espèce diploïde c'est-à-dire que son matériel génétique est $2n=74$ chromosomes.

Polypodium vulgare est une plante qui se plaît dans les régions humides. On le retrouve souvent dans le Massif Centrale mais aussi en Bretagne ainsi que les régions à haute altitude comme les Pyrénées ou les Alpes. Un rhizome traçant porte des feuilles pouvant aller de 15 à 30 centimètres de long. Quant à son limbe, il est vert foncé, légèrement luisant brusquement réduit au sommet par une longue pointe. Ses sores sont ronds, petits et bruns. Ses spores sont plus petites que *Polypodium interjectum*, ce qui permet de les différencier. Le Polypode commun est une espèce allotétraploïde c'est-à-dire que son matériel génétique est $2n=148$ chromosomes.

Polypodium interjectum est le plus répandu sur le territoire français et notamment dans le centre de la France, en Limousin. Il est aussi très présent en Bretagne. Le rhizome rampant de ce polypode permet d'avoir souvent de grandes populations. Ses feuilles sont comme les deux espèces précédentes hautes de 15 à 30 centimètres. Elles sont vertes plus claires que le Polypode commun avec un limbe assez mat. Assez large dans les deux premiers tiers, il se réduit progressivement au sommet. Ses sores sont gros, oranges et ovales. Comme il est dit précédemment, ses sporanges sont plus gros que ceux de *Polypodium vulgare*. C'est une espèce allohexaploïde, $2n=222$ chromosomes. Ce matériel génétique s'explique par le fait que *Polypodium interjectum* est issu d'un croisement entre *Polypodium cambricum* et *Polypodium vulgare*.

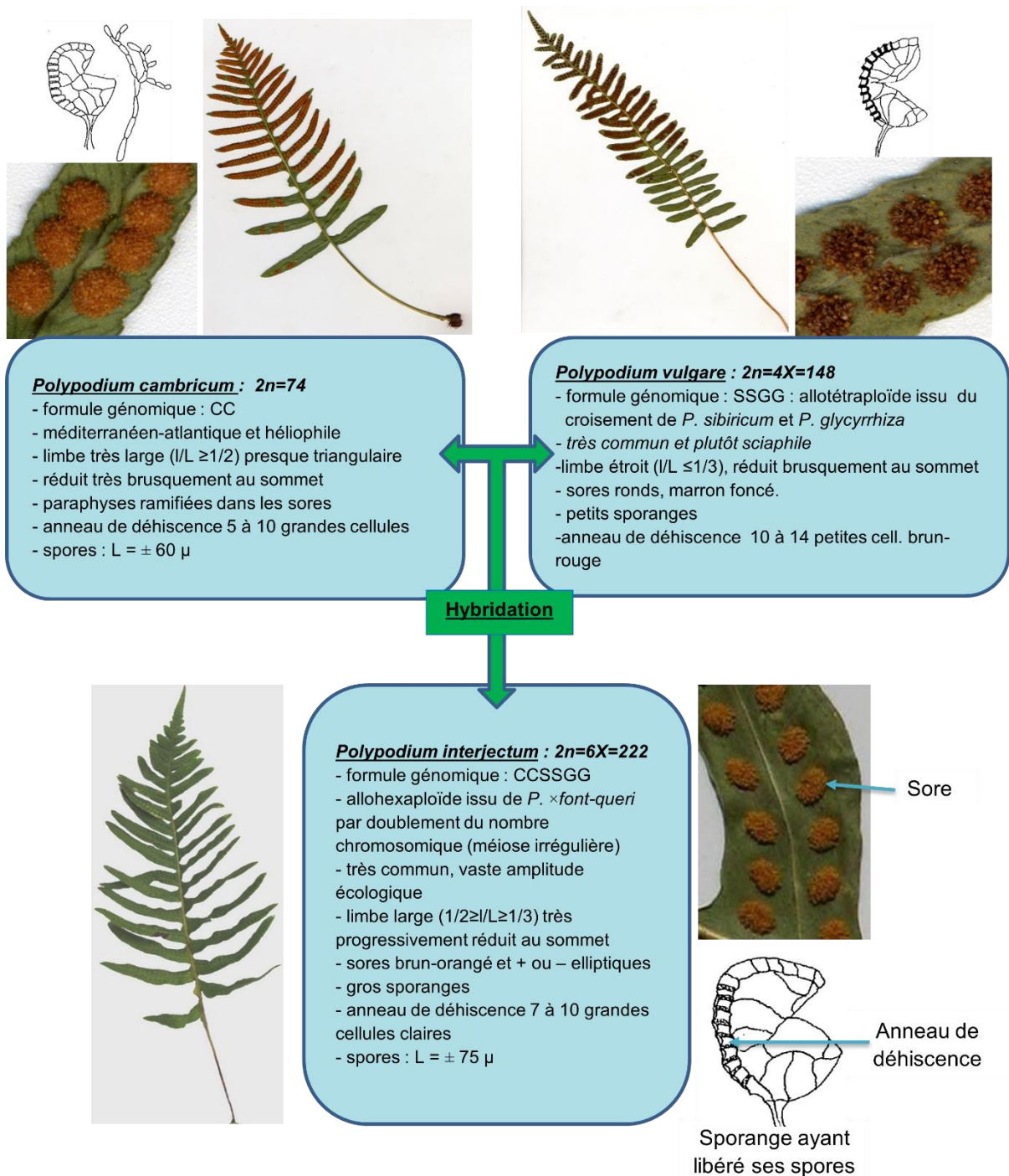


Figure 18 : *Polypodium interjectum*, descendant de *Polypodium cambricum* et *Polypodium vulgare* d'après le poster « Caractères morphologiques des différents taxons de Polypodes de France métropolitaine, Froissard D, Fons F, Boudrie M, Chabrol L, Rapior S ».

La Figure 18 : *Polypodium interjectum*, descendant de *Polypodium cambricum* et *Polypodium vulgare* d'après le poster « Caractères morphologiques des différents taxons de Polypodes de France métropolitaine, Froissard D, Fons F, Boudrie M, Chabrol L, Rapior S ». nous résume les principales caractéristiques de ces trois polypodes. Le principal moyen de reconnaître *Polypodium interjectum* est la forme du limbe, large qui se réduit très progressivement au sommet. Il présente des sores plus gros et de forme elliptique marron

orangé contrairement au Polypode commun qui produit des sores plus grandes et rondes et de couleur marron foncé. Une différence existe aussi au niveau de l'anneau de déhiscence, *Polypodium interjectum* présente moins de cellules (7 à 10) contrairement à *Polypodium vulgare* (plus de 10 cellules). A maturité, cet anneau mécanique se contractera et exercera une tension telle que les tissus du sporange vont se déchirer et libérer ainsi les spores contenues. Le Polypode du pays de Galles préfère les climats méditerranéens et ne pousse pas au-delà de 500 mètres d'altitude. Il se reconnaît plus facilement à ses frondes souvent plus larges que longues et à son apex qui se réduit brusquement en une longue pointe (2).

Ainsi le Polypode intermédiaire contient un génome complet de chacun de ses deux parents. Ce qui laisse supposer qu'il peut probablement porter tout ce qui entre en jeu dans l'héritage génétique, notamment les molécules synthétisées par les parents.

I.3.2. Les principales molécules présentes chez les polypodes

Les polypodes produisent de nombreux métabolites secondaires qui ont, pour certaines molécules, des propriétés intéressantes. Un examen phytochimique de la racine de polypode commun a été décrit dans un article de Jermstad et al (1949)(12), les différentes molécules retrouvées étaient (13) :

- Des ions en grande quantité notamment K, Na, Ca et Mg. On retrouve aussi en plus petite quantité Mn, Al, Fe, Ba et Sr. Des traces de Cu, Ag, Ni et Co ont aussi été relevées.
- Des sucres ont été retrouvés aussi selon la méthode de Bourquelot. En effet le rhizome sec contient des sucres invertis (glucose et fructose), du sucrose et de petites quantités de pentoses.
- Des acides organiques : acide citrique, acide malique, acide caféique, acide chlorogénique ainsi que des traces d'acide ascorbique.
- Plusieurs corps gras notamment du glycérol, des dérivés d'acide linoléique et d'esters palmitique et oléique.
- Des mucilages et de la sève.
- Des glycosides et phytostérols comme l'osladine et ses dérivés.

En 1967, une étude plus approfondie de Jizba et Herout (12) met en évidence la présence de polypodine A et B, de polydine, de saponine I et II, d'autres triterpénoïdes et de la samambaine (11).

Certaines de ces molécules présentent des propriétés médicinales. Les propriétés antivirales du polypode ont été testées en 1986 dans un article par Husson et al (15). Des extraits des différentes parties de la plante ont été déposés sur des cellules de rat. En premier lieu, l'un des extraits qui était le plus intéressant dans les études préliminaires était celui qui contenait la racine de polypode car il présentait une forte activité notamment antivirale.

Des propriétés antibactériennes ont aussi été mises en évidence chez le Polypode vulgaire dans l'étude polonaise de Glensk (16). Cette plante était autrefois utilisée en Pologne en cas d'infection urinaire. Ainsi des expérimentations à base d'extrait de *Polypodium vulgare* ont été menées sur des souches d'*Escherichia coli*, principale bactérie impliquée dans les infections urinaires. Il en ressort qu'une activité antibactérienne a été mise en évidence. L'auteur pense qu'elle est due au Polypode vulgaire même s'il n'écarte pas l'hypothèse que plusieurs molécules peuvent être actives sur les bactéries dans cette plante.

Une phytohormone chez le polypode présente des propriétés particulières : l'ecdystérone autrement appelée polypodine A. Cette molécule a une structure proche de la molécule responsable de la mue chez certains animaux, l'ecdysone. L'ecdystérone pourrait provoquer une mue indésirable et peut donc être utilisée comme insecticide voir acaricide. De plus, cette molécule étant présente dans le rhizome de la plante, cela permettait de mettre en évidence le fait que des composés de type hormonal peuvent être des facteurs exogènes pouvant influencer le comportement de l'animal à travers son alimentation. Cette molécule pourrait être un moyen de défense de la plante contre sa consommation par les herbivores(17) (18).

Des expériences *in vivo* ont été effectuées par Mannan et al (1989) (19) sur des souris et des rats et de nombreuses pistes sur les différentes activités de la racine de polypode ont été retenues. L'administration d'extrait de polypode à des souris permettrait d'augmenter la fréquence cardiaque, provoquerait une baisse de la vigilance, une passivité légère et une baisse de l'activité locomotrice ainsi qu'une piloérection. Une activité antispasmodique liée à la dépression du système nerveux central a aussi été remarquée ainsi qu'un effet hypodermique et antipyrétique. Ces effets étaient dose dépendant et, même à dose maximale, aucun animal n'est mort. Les auteurs ont conclu que l'extrait de racine de polypode semble agir au niveau des centres sous-corticaux. A moins forte dose, un effet hypotenseur a été observé chez les rats, probablement à cause d'une vasodilatation due à une stimulation des récepteurs β -adrénergiques. Cependant, étant donné qu'à forte dose les rats présentaient une augmentation de la fréquence cardiaque, un redressement des poils et une élévation de la pression artérielle, cela suggère aussi une stimulation des récepteurs α -adrénergiques. Les effets antitussifs et expectorants du polypode ont été expliqués par Hostettmann et Marston (1995) :

"L'irritation de la gorge et des voies respiratoires augmente probablement le volume du liquide respiratoire en attirant plus d'eau dans les sécrétions bronchiques, diluant ainsi le mucus et réduisant sa viscosité. L'activité de surface des saponines peut rendre les expectorations moins visqueuses, ce qui rend le mucus plus mobile et plus facile à éjecter. Une autre possibilité est que la nature amphiphile des saponines les fait se propager sous forme de film monomoléculaire à l'arrière de la gorge et par la suite aide à éliminer le mucus."

C'est pourquoi le polypode est depuis longtemps utilisé dans le cas de nombreuses affections respiratoires : les toux, rhumes, coqueluche, tuberculose... Les racines de polypodes sont aussi utilisées depuis longtemps comme laxatifs, diurétiques et stimulants de la digestion. Cependant la molécule que l'on retrouve chez le polypode qui nous intéresse pour ses différentes propriétés est l'osladine. Voyons cette molécule de plus près.

I.3.3. L'osladine

L'osladine est une saponine ou saponoside. Ces molécules sont des hétérosides le plus souvent à génine stéroïdique ou triterpénique. Elles sont très utilisées pour leurs propriétés hémolytiques mais aussi tensioactives notamment par la formation de mousse par agitation dans l'eau, le savon.

Le nom osladine vient du mot polypode en tchèque « Osladič ». Sa nomenclature est la 26-O- α -L-rhamnopyranosyl-(22R,25S,26R)-22,26-époxy-6-oxo-5 α -cholestan-3 β ,26-diol-3-o- α -L-rhamnopyrano-syl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside.

OSLADIN

22*R*,26*R*-Epoxy-6-oxo-25*S*-5 α -cholestan-3 β ,26-diol 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside]-26-O-[α -L-rhamnopyranoside]

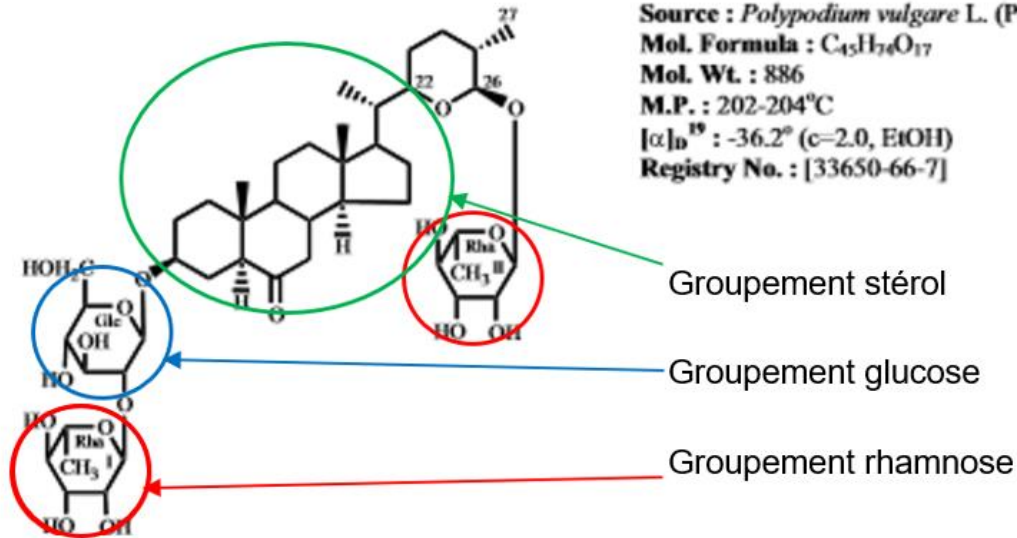


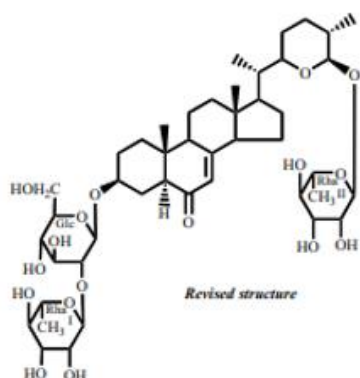
Figure 19 : structure de l'osladine

La Figure 19 : structure de l'osladine nous montre que la structure principale de l'osladine est un stérol sur lequel différents groupements sont greffés.

Cette saponine présente une saveur sucrée 500 fois plus forte que le sucrose. Elle est retrouvée dans le rhizome et est responsable de son goût sucré. On retrouve chez le polypode aussi trois polypodosides qui dérivent de l'osladine : A, B et C. Cependant seul le polypodoside A et l'osladine présentent des propriétés sucrantes.

POLYPODOSIDE A

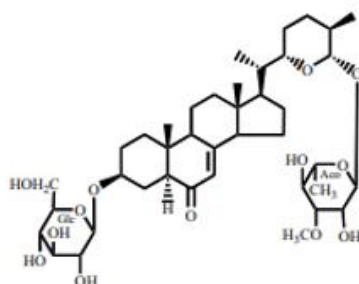
Polypodogenin-3-O- α -L-rhamnopyransyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-26-O- α -L-rhamnopyranoside



Source : *Polypodium glycyrrhiza* D.C. Eaton¹
(Polypodiaceae), *P. vulgare* L.²
Mol. Formula : C₄₃H₇₂O₁₇
Mol. Wt. : 884
M.P. : 198-200°C¹
[α]_D : -37° (c=0.3, MeOH)¹
Registry No. : [119784-25-7]

POLYPODOSIDE C

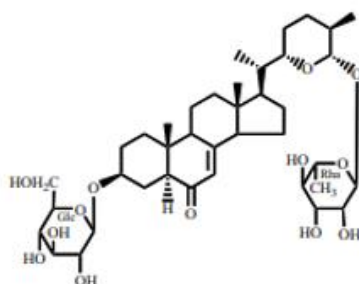
Polypodogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl-26-O- α -L-acropyranoside



Source : *Polypodium glycyrrhiza* D.C. Eaton.
(Polypodiaceae)
Mol. Formula : C₄₀H₆₄O₁₃
Mol. Wt. : 752
M.P. : 200-202°C
[α]_D : -26.3° (c=0.3, MeOH)
Registry No. : [120015-17-0]

POLYPODOSIDE B

Polypodogenin 3-O- β -D-glucopyranoside-26-O- α -L-rhamnopyranoside



Source : *Polypodium glycyrrhiza* D.C. Eaton
(Polypodiaceae)
Mol. Formula : C₃₉H₆₂O₁₃
Mol. Wt. : 738
M.P. : 207-209°C
[α]_D : -27.0° (c=0.1, MeOH)
Registry No. : [120015-16-9]

Figure 20 : Polypodoside A, B et C

Cela est dû à la conformation de leur structure comme on peut le voir sur la Figure 19 : structure de l'osladine. La structure plane de l'osladine est connue depuis 1967 cependant les premiers essais de synthèses de cette molécule n'avaient pas permis d'obtenir le goût sucré de réglisse. Ce n'est qu'en 1994 que le Professeur Mugio Nishizawa découvre la conformation exacte de cette molécule, par cristallographie au rayon X, et permet ainsi d'obtenir le goût sucré. Ce fut la première saponine à être entièrement synthétisée (20).

Aujourd'hui, on arrive à faire des synthèses totales afin d'obtenir de l'osladine ainsi que des héli-synthèses notamment à partir de diosgénine. Cependant son utilisation comme substitut au sucre est limitée par sa mauvaise solubilité aqueuse. En effet, elle est fortement soluble dans l'éthanol et faiblement dans l'eau. De plus l'osladine serait présente à hauteur de 0.03% (21) du poids de la plante sèche. Cette faible concentration peut être expliquée par le fait que l'osladine est présente majoritairement dans le rhizome.

À la suite d'observations multiples, il apparait clairement que le rhizome du polypode surnommé « réglisse des bois » présente effectivement après une première saveur très amère, un goût de réglisse prononcé suivi d'un goût sucré. Cependant cette saveur de réglisse peut être très marquée à peu prononcée selon les échantillons. Il convient donc de déterminer quels sont les paramètres qui peuvent faire varier son intensité : l'espèce ; la saison de récolte ; l'exposition ; le support sur lequel pousse la plante ; la situation géo-climatique. Il conviendrait ensuite de caractériser une méthode d'extraction et de dosage fiable de l'osladine. Cette problématique sera à l'origine de la partie expérimentale de ce mémoire.

II. Expérimentations sur les fougères du Limousin

II.1.1. Récolte des échantillons et Recherche de la méthode d'extraction de l'osladine, méthode de J. REISCH et A.M DAWIDAR

En amont nous avons récolté des rhizomes de *Polypodium interjectum* dans une forêt à une dizaine de kilomètres de Limoges (87), au lieu-dit Chalucet. Nous avons récolté environ 1 kilogramme de rhizomes frais en juin 2020. La zone de récolte était un endroit frais, humide et proche d'un ruisseau exposé plein Nord (Figure 20 : trois différents lieux de récoltes de *Polypodium interjectum* : un rocher, une racine d'arbre et un sol couvert de mousse). Nous les avons fait sécher dans un endroit sec à l'abri de la lumière pendant plusieurs semaines, nous avons obtenu 441 grammes de rhizomes secs. Ensuite ils sont réduits en poudre à gros grains avec laquelle nous allons faire nos expériences.



Figure 20 : trois différents lieux de récoltes de *Polypodium interjectum* : un rocher, une racine d'arbre et un sol couvert de mousse



Figure 21 : Rhizomes secs et épluchés de *Polypodium interjectum* avant la mise en poudre

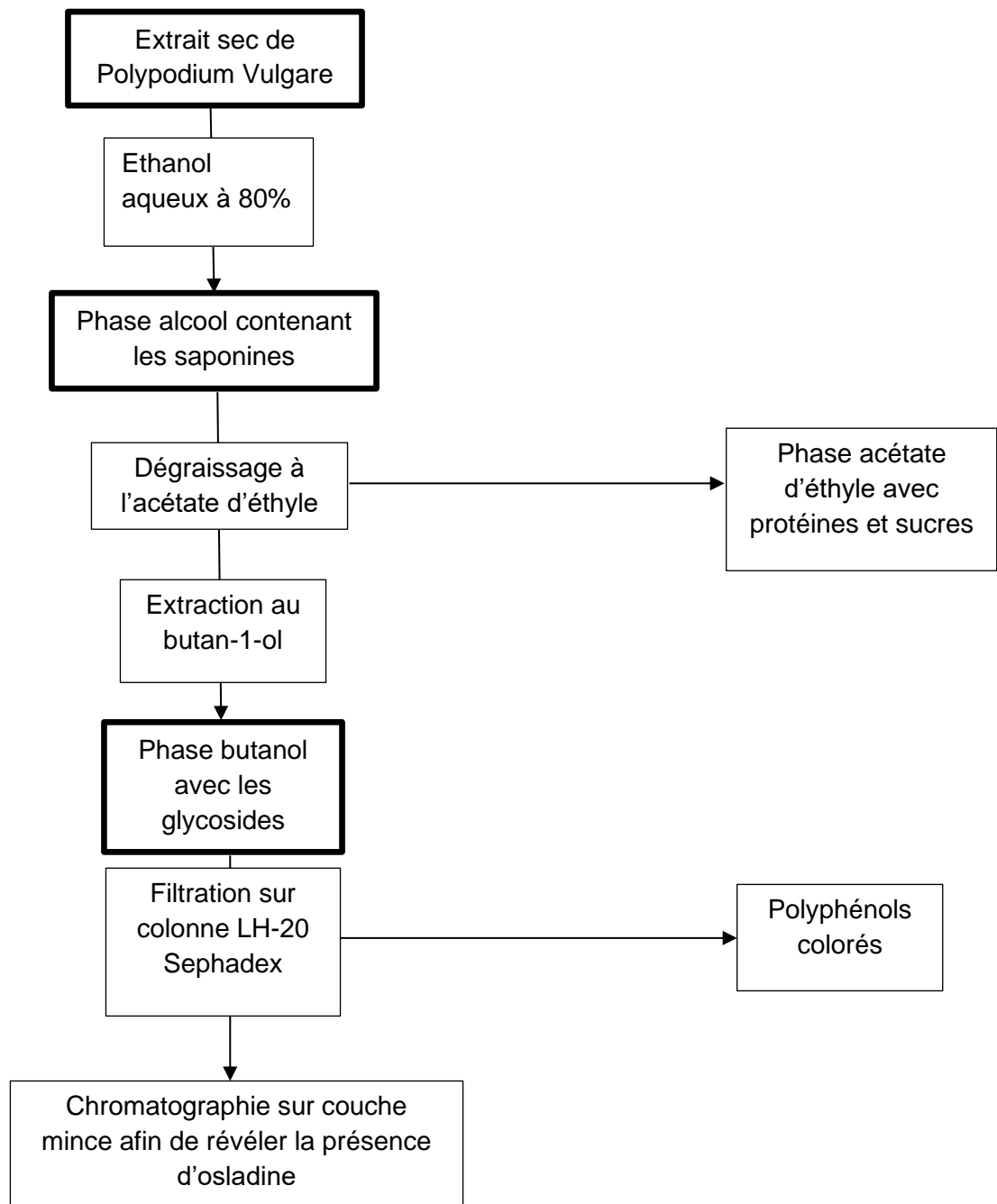
Dans la bibliographie, différentes méthodes d'extraction sont évoquées faisant référence à des publications elles-mêmes citant des références de plus en plus anciennes. Afin de trouver une technique nous avons sélectionné deux méthodes. La première est extraite de Reisch et Dawidar (1978) et la seconde de A. Simon et al en 2011. Nous allons par la suite essayer de nous inspirer de ces deux méthodes pour faire une extraction qualitative de l'osladine dans les racines de *Polypodium interjectum* que nous avons récoltées au préalable.

II.1.2. Extraction selon la méthode de J. REISCH et A.M DAWIDAR

La première étant la succession de plusieurs extractions avec deux phases liquides puis une chromatographie sur couche mince. Cette méthode est extraite de la publication de J. Reisch et A.M. Dawidar datant de 1978 « **Detection of Osladin in the Aerial Parts of *Polypodium Vulgare L.*** ». Dans cette publication, les deux scientifiques allemands ont cherché à montrer que l'osladine était présente dans les parties aériennes de la plante. Ainsi, ils ont récolté du *Polypodium vulgare L.* dans le sud du Tyrol qu'ils ont, ensuite, extrait avec de l'éthanol aqueux à 80%. La phase alcoolique est ensuite dégraissée avec de l'acétate d'éthyle puis extraite avec du butan-1-ol. Les glycosides sont ainsi transférés dans le butanol et sont débarrassés des sucres et protéines. Par cette méthode, ils arrivent à récupérer environ 10% de saponines brutes à partir du poids sec de l'échantillon. Ces saponines brutes sont ensuite partiellement débarrassées des polyphénols colorés par filtration sur gel colonne Sephadex. Une chromatographie sur couche mince est ensuite réalisée et révèle la présence de huit composants dont un qui est identifié comme l'osladine par sa couleur et le rapport frontal identique au témoin de l'osladine (17).

En effet, la chromatographie sur couche mince est réalisée avec une plaque en silice laissée en migration dans une cuve avec comme solvant butan-1-ol, acide acétique et eau distillée (4 :1 :2). Après migration, les rapports frontaliers du témoin d'osladine et d'un des composants de l'extrait sont de 3,7 tous les deux. De plus pour confirmer qu'il y a bien une présence d'osladine, les couleurs sont identiques c'est-à-dire jaune.

Cette méthode est donc efficace pour mettre en évidence l'osladine, cependant elle reste limitée car elle n'est pas quantitative. Le matériel et les matières pour l'extraction ainsi que le témoin utilisés ne sont pas facilement procurables. De plus les quantités, volumes, temps et autres paramètres ne sont jamais clairement indiqués dans la publication.



Extraction de différentes saponines selon la méthode de Reisch et Dawidar

II.1.3. Adaptation et expérimentation de la méthode de J. REISCH et A.M DAWIDAR

La méthode utilisée par Reisch et Dawidar nécessitait du matériel et des solvants dont nous ne disposons pas à la faculté de pharmacie. Nous avons donc adapté cette méthode à notre matériel et à nos solvants tout en essayant de rester le plus fidèle possible à la méthode.

Nous avons prélevé 100 grammes de la poudre de rhizome que nous avons mis en solution dans 500 millilitres d'éthanol aqueux à 70% (Figure 22 : poudre de rhizomes dans l'éthanol aqueux avant agitation). Nous avons obtenu une solution que nous avons laissée agiter pendant 3 heures avec un barreau aimanté. Ensuite nous avons filtré sur Büchner afin d'enlever toutes les grosses particules, on obtient qu'un liquide rougeâtre à brun.

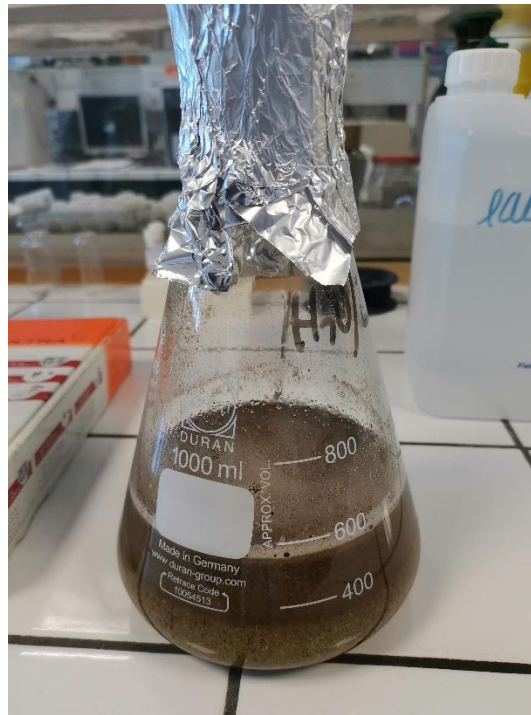


Figure 22 : poudre de rhizomes dans l'éthanol aqueux avant agitation

Nous avons « dégraissé » cette solution avec de l'acétate d'éthyle en faisant une extraction liquide/liquide (Figure 23 : extraction liquide/liquide avec l'acétate d'éthyle). Après quatre extractions à l'acétate d'éthyle (ajout de 300mL à chaque extraction) il reste environ 240 mL sur les 500 mL de départ de notre phase éthanol aqueux.



Figure 23 : extraction liquide/liquide avec l'acétate d'éthyle

Cette phase est ensuite mélangée à 120 mL de butan-1-ol puis la phase butan-1-ol qui contient les saponosides est récupérée. Nous faisons évaporer la partie liquide avec un évaporateur rotatif (Figure 24 : évaporation de la phase butanol pour obtenir un extrait sec) afin d'obtenir une poudre concentrée des composants restants. Ensuite cet extrait est dilué dans un peu d'éthanol afin d'effectuer les dépôts de chromatographies sur couche mince que nous verrons plus tard.



Figure 24 : évaporation de la phase butanol pour obtenir un extrait sec

II.2. Recherche de la méthode d'extraction de l'osladine, méthode de A. SIMON et al

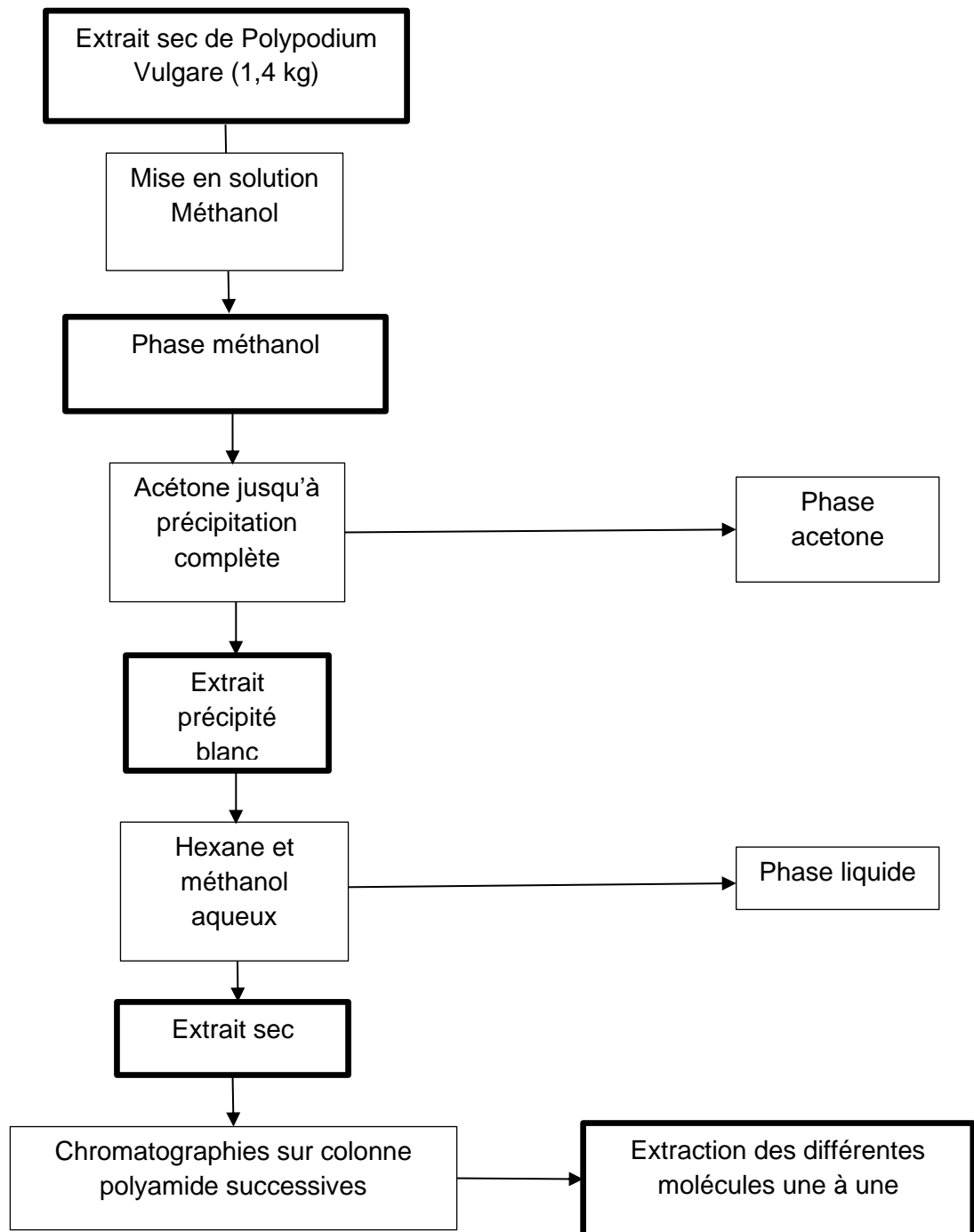
Nous allons ensuite adapter la méthode de Simon afin de la réaliser puis nous comparerons les résultats obtenus avec les deux méthodes.

II.2.1. Extraction selon la méthode de A. SIMON et al

La seconde méthode qui a retenu notre attention est celle de András Simon, un chercheur hongrois ayant effectué de nombreuses extractions de plantes notamment sur le genre *Polypodium*. En 2011, il publie une étude avec ses collègues sur les ecdystéroïdes, « **Ecdysteroids from *Polypodium vulgare L*** » dans laquelle il détaille une extraction de différentes molécules présentes chez le Polypode vulgaire (18).

Dans un premier temps, ils font sécher 1,4 kg de rhizomes de Polypode vulgaire qu'ils mettent en solution avec du méthanol après broyage. Ensuite, ils ajoutent de l'acétone qui précipite une partie de la solution. Ce précipité est resolubilisé dans un mélange hexane/méthanol aqueux. On récupère la phase méthanol aqueux que l'on fait sécher. Avec ce résidu sec les chercheurs hongrois ont fait plusieurs chromatographies en phase inversée afin d'extraire une à une les molécules d'ecdystéroïdes. Ils arrivent à identifier chacune des molécules par spectroscopie, dont l'osladine.

L'intérêt de cette méthode est que les quantités sont plus précises que dans la première méthode. On peut donc la refaire sans trop s'éloigner de la méthode de base des chercheurs. Cependant la chromatographie en phase inverse qui permet de séparer la dizaine de composés extraits en fonction de leur polarité peut être difficile à mettre en place.



Extraction d'ecdystéroïdes selon la méthode de Simon et al.

II.2.2. Adaptation et expérimentation de la méthode de A. SIMON et al.

La première partie de la méthode de Simon utilise des solvants relativement courant et facilement accessibles, en revanche la seconde partie nécessite du matériel spécifique. C'est pourquoi nous décidons de nous inspirer de cette première partie de la méthode et de faire ensuite des chromatographies sur couches minces afin de les comparer avec les chromatographies de la première méthode d'extraction.

En premier lieu nous mettons 100 grammes de poudre de rhizomes en solution dans 500 mL de méthanol. Nous laissons agiter 3 heures avec un barreau aimanté. Nous obtenons une solution verte (Figure 25 : solution après agitation barreau aimanté (méthanol et poudre de rhizome)) avec un dépôt qui correspond à la poudre de rhizome.



Figure 25 : solution après agitation barreau aimanté (méthanol et poudre de rhizome)

Cette solution est ensuite filtrée avec du papier filtre puis nous récupérons la phase filtrée pour la faire évaporer sur un évaporateur rotatif (Figure 26 : évaporation rotative de la solution méthanol/poudre de rhizome) à 60 degrés Celsius pendant environ une heure. On voit tout de suite que la solution devient plus concentrée grâce à la couleur de la solution plus sombre qui témoigne de l'évaporation du méthanol.



Figure 26 : évaporation rotative de la solution méthanol/poudre de rhizome

On récupère l'extrait une fois que le solvant s'est évaporé puis on rajoute de l'acétone. L'acétone va précipiter une partie de la solution sous forme d'agglomérats blancs (Figure 27 : acétone faisant précipiter la solution). On ne récupère que les agglomérats blancs que nous faisons ensuite sécher sur Büchner afin d'enlever toute trace de solvant.



Figure 27 : acétone faisant précipiter la solution

Cet extrait sec est ensuite resolubilisé dans un mélange de 100 mL de méthanol aqueux (70% méthanol, 30% eau) afin de réaliser une extraction liquide/liquide à l'hexane. On ajoute dans une ampoule à décanter de 250mL notre solution puis 30 mL d'hexane. On récupère notre phase inférieure qui correspond à notre phase méthanol/eau et on enlève la phase supérieure qui correspond à la phase hexane. Cette phase va piéger les chlorophylles

notamment ce qui explique sa coloration verte. On répète cette opération jusqu'à ce que la phase hexane ne se colore plus en vert. Ce qui confirme que toutes les chlorophylles ont été éliminées.

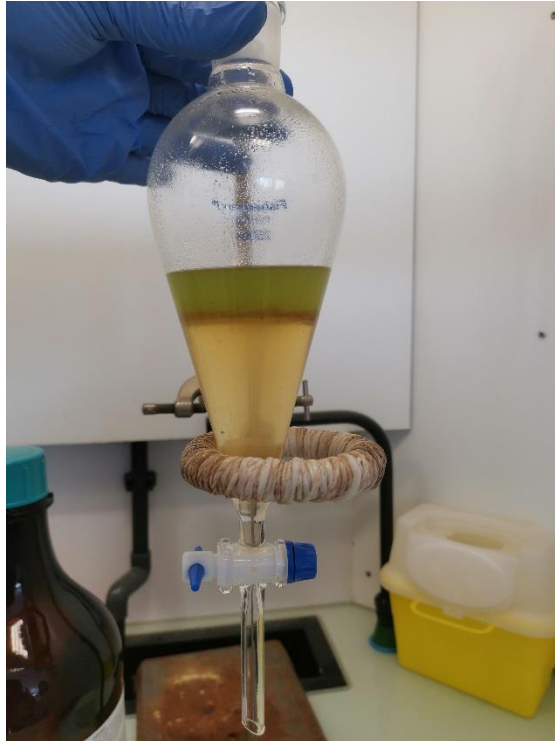


Figure 28 : extraction liquide/liquide de la solution méthanol aqueux à l'hexane

Après avoir récupéré la phase méthanol aqueux, on fait évaporer le solvant à l'évaporateur rotatif à 60 degrés Celsius pendant une heure pour obtenir un extrait sec. Cet extrait sec nous permettra de faire des chromatographies sur couches minces que nous pourrions comparer avec l'extraction de Reisch.

II.3. Expérimentations sur *Polypodium interjectum* du Limousin

II.3.1. Comparaison des résultats des deux méthodes

Grâce aux deux expériences précédentes nous avons obtenu plusieurs chromatographies sur couche mince que nous allons faire migrer en même temps. Nous avons observé dans la littérature deux principales phases mobiles que nous retenons pour faire migrer nos chromatographies. Une phase mobile composée de butanol/acide acétique/eau distillée (12 :3 :6) ainsi qu'une phase cyclohexane/acétate d'éthyle (14 :6). Sur chaque chromatographie nous avons fait différents dépôts issus des différents stades de l'extraction sans témoin d'osladine car nous n'en disposons pas.

Nous faisons migrer les plaques dans les deux phases mobiles en même temps cependant la phase cyclohexane/acétate d'éthyle est beaucoup plus rapide à migrer, environ une heure, alors que la phase butanol/acide acétique/eau distillée migre plus de 2 heures (Figure 29 : une plaque de chromatographie de chaque méthode en migration dans la phase butanol/acide acétique/eau distillée).

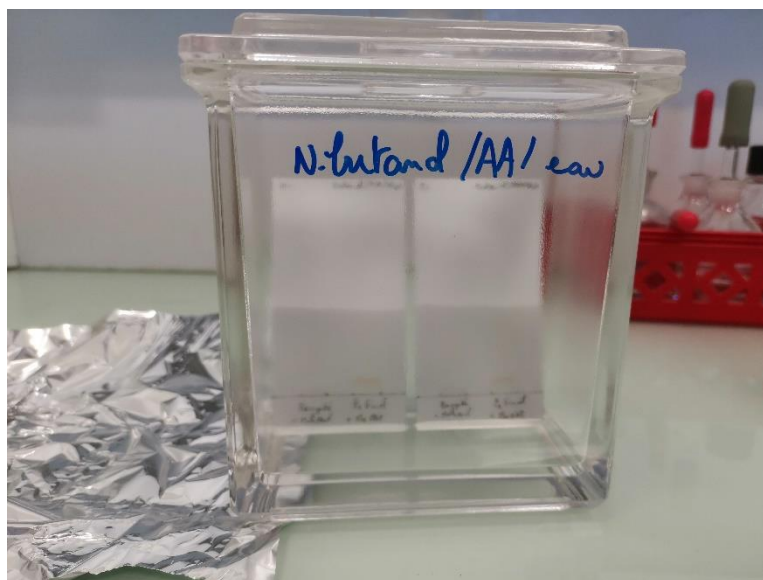


Figure 29 : une plaque de chromatographie de chaque méthode en migration dans la phase butanol/acide acétique/eau distillée

Nous commençons donc par les chromatographies des deux méthodes dans la phase cyclohexane. Après leurs migrations, nous les avons laissés sécher et observés à l'œil nu et sous lumière UV (365 et 254 nm) nous ne voyons rien de particulier. Nous décidons d'utiliser deux révélateurs différents : un réactif à base d'acide sulfurique à 50% et de l'ANS à 5% et nous faisons ensuite sécher à l'étuve à 70 degrés pendant 5 minutes. Cependant même avec ces réactifs, aucune tache ne ressort clairement sur les chromatographies.

Une fois que les chromatographies dans la phase butanol/acide acétique/eau distillée ont fini de migrer, on applique le même protocole. A l'œil nu ou UV et sans révélateur, on n'observe aucune tache. On décide d'utiliser les mêmes réactifs que précédemment c'est-à-dire ANS 5% et Acide sulfurique 50%. On observe alors plusieurs taches.

Dans la méthode de Reisch, il utilise de l'acide sulfurique à 50% et explique que la couleur du témoin de l'osladine est jaune. De plus, le rapport frontalier de l'osladine est de 3.7 dans une phase mobile similaire à la nôtre : butanol/acide acétique/eau distillée (4 :1 :2). Nous utilisons donc comme « référent » la chromatographie de Reisch (Figure 30 : Chromatographie selon la méthode de Reisch, extrait final à droite dans phase butanol/acide acétique/eau distillée révélé à l'acide sulfurique 50%).

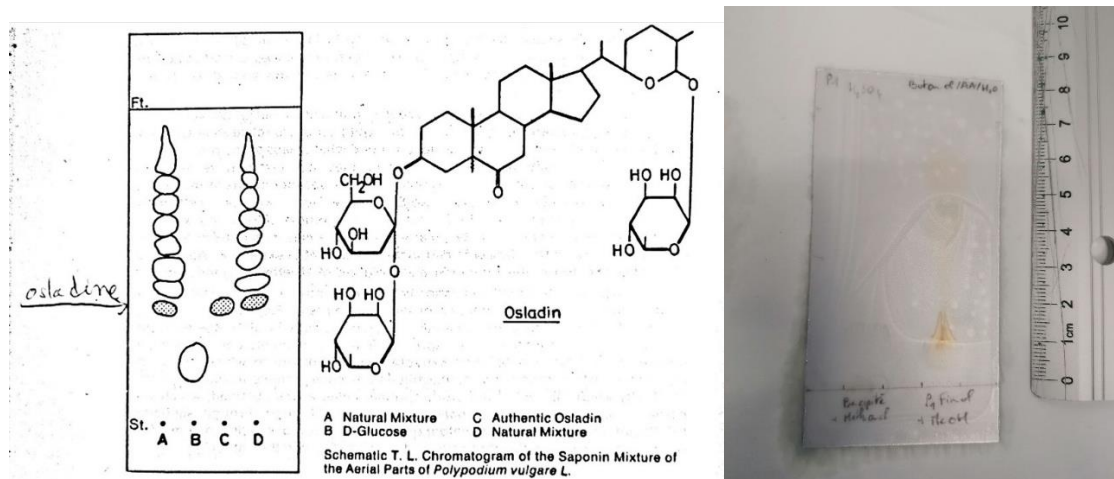


Figure 30 : Chromatographie selon la méthode de Reisch, extrait final à droite dans phase butanol/acide acétique/eau distillée révélé à l'acide sulfurique 50%

Ainsi nous décidons de comparer les chromatographies et le résultat est flagrant. La phase mobile cyclohexane/acétate d'éthyle n'est pas la plus optimale pour faire migrer les composés de la racine de polypode comparée à la phase butanol/acide acétique/eau distillée comme on peut le voir sur la Figure 31 : à gauche, phase cyclohexane/acétate d'éthyle, à droite phase butanol/acide acétique/eau distillée. Réactif ANS 5%.

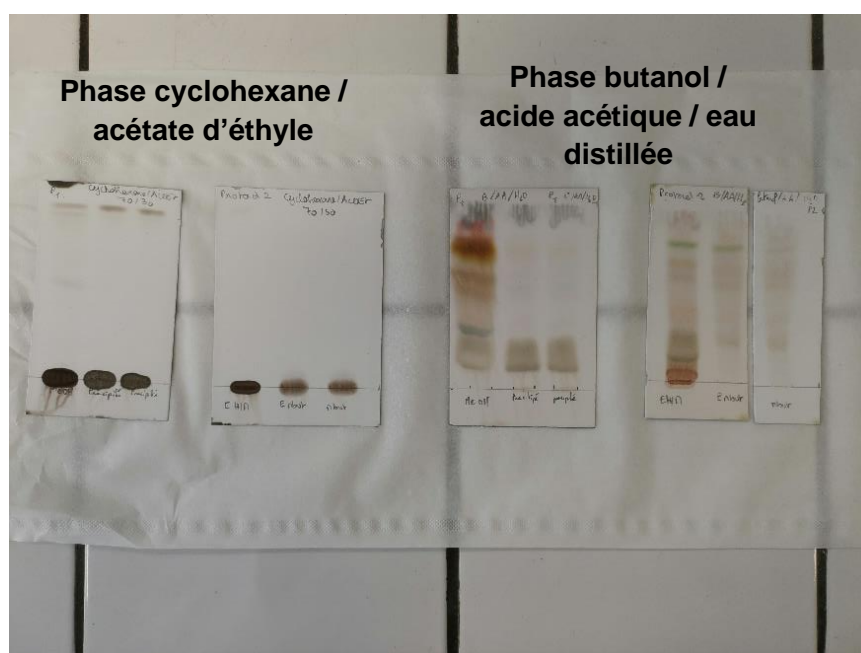


Figure 31 : à gauche, phase cyclohexane/acétate d'éthyle, à droite phase butanol/acide acétique/eau distillée. Réactif ANS 5%

Pour chaque réactif utilisé, on utilise les chromatographies avec les mêmes dépôts, même phase mobile (butanol/acide acétique/eau distillée) et on compare les plaques (Figure 32 : résultats des deux méthodes d'extractions dans phase mobile butanol/acide acétique/eau distillée. A gauche et au milieu réactif ANS 5%, à droite le « référent » acide sulfurique à 50%).

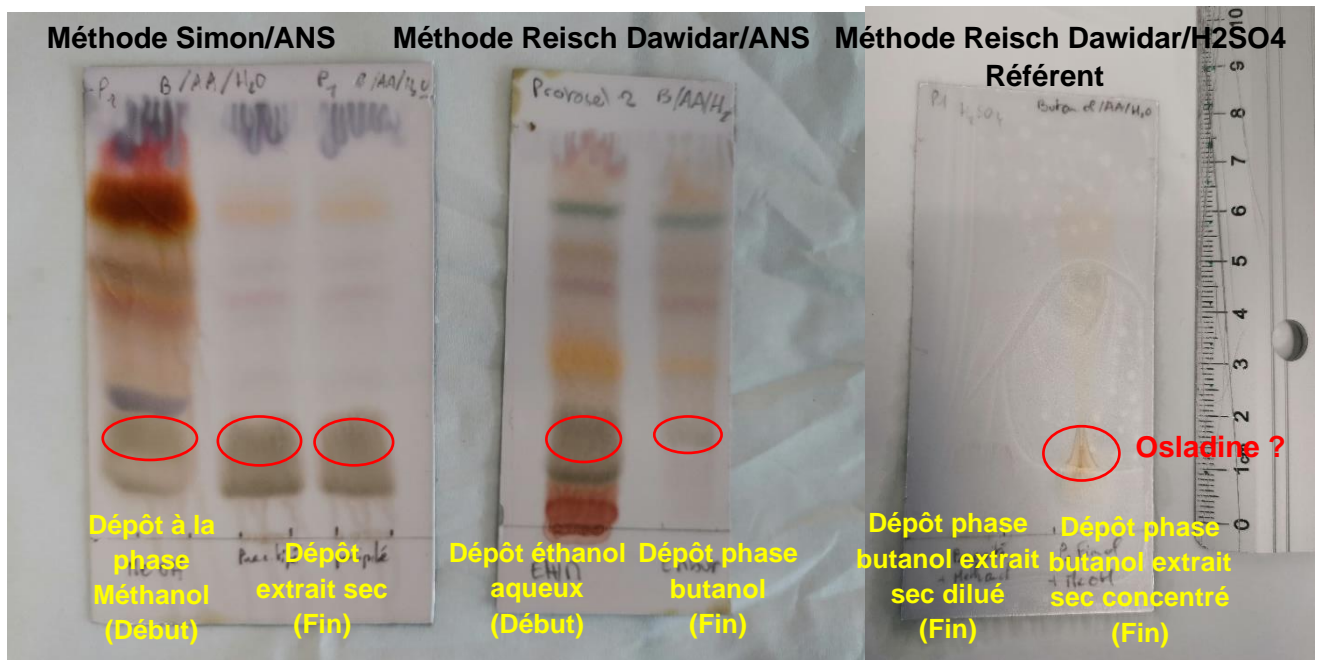
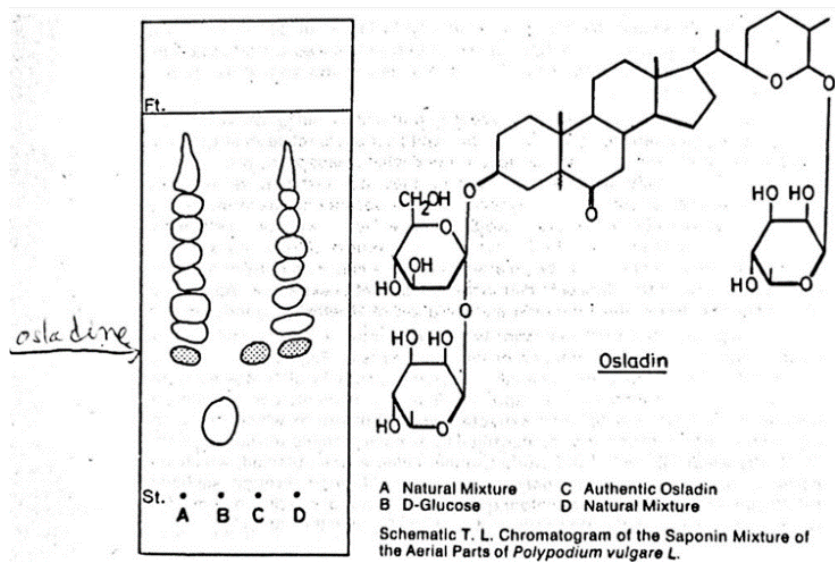


Figure 32 : résultats des deux méthodes d'extractions dans phase mobile butanol/acide acétique/eau distillée. A gauche et au milieu réactif ANS 5%, à droite le « référent » acide sulfurique à 50%

Si on se réfère au Rapport frontalier utilisé dans la méthode de Reisch (Figure 33 : Chromatographie et rapports frontaux de l'expérience de Reisch), on aperçoit deux taches « vert kaki » en commun qui sont présentes dans les deux méthodes d'extractions. La plus facilement observable étant celle de la méthode de Simon. Ainsi on pourrait supposer que la tache vert kaki correspond à l'osladine sur les deux méthodes différentes.



Tab. Thin-layer chromatography of the saponin extract of the aerial parts of *Polypodium vulgare* L.

R _f	Colour	R _f	Colour
8.0	reddish-brown	5.7	brown
7.5	light brown	5.1	yellow
7.0	brown	4.4	brown
6.3	reddish brown	3.7	yellow, same as osladin*)

Figure 33 : Chromatographie et rapports frontaux de l'expérience de Reisch

Nous pouvons conclure que la méthode dérivée de celle de Simon est la plus adéquate et que les résultats sont plus exploitables comparés à la méthode de Reisch. Le plus évident serait donc d'utiliser la méthode de Simon avec la phase butanol/acide acétique/eau distillée (4 : 1 :2) comme phase mobile et l'ANS 5% comme réactif. Cependant l'absence d'un témoin d'oslidine ne nous permet pas de confirmer ces hypothèses.

III. Discussion

Après avoir effectué ces deux expérimentations, nous pouvons conclure que ces deux méthodes sont différentes en de nombreux points. Tout d'abord, en absence de témoin, nous ne pouvons affirmer catégoriquement la présence d'osladine même si tout porte à le croire. La première méthode, celle de Reisch et Dawidar semble peut être plus simple car elle ne nécessite pas énormément de composants et de solvants bien spécifiques. Mais nous pouvons voir aussi sur les chromatographies que cette méthode ne permet pas d'obtenir uniquement l'osladine. On obtient plusieurs molécules qui semblent englober un large groupe de saponines. Cette méthode est donc moins précise pour obtenir uniquement l'osladine et plus difficile à mettre en œuvre par ses différentes étapes. En effet, la filtration sur Büchner est complexe à effectuer sur de grandes quantités et les réactifs à base d'acide sulfurique sont dangereux et nécessitent une précaution d'emploi particulière. Ces quelques problèmes peuvent s'expliquer par l'ancienneté de la méthode qui date de 1978 ainsi que des ressources dont disposaient les deux chercheurs polonais (17,18).

Pour la seconde méthode, celle de Simon, nous pouvons également supposer la présence d'osladine. Cette molécule est en quantité plus importante par rapport aux autres tâches sur les chromatographies que la première méthode à dose équivalente. La prédominance de l'osladine permet donc de montrer qu'elle est plus sélective. Les solvants sont moins dangereux à manipuler et les méthodes d'extractions sont beaucoup plus accessibles. Cette méthode semble la plus indiquée pour extraire de l'osladine à petite échelle si l'occasion de faire du quantitatif se présentait.

D'ailleurs, pourquoi l'osladine, cette molécule naturelle au fort pouvoir sucrant n'est-elle pas utilisée dans l'industrie agro-alimentaire ? Il n'y a pas besoin de la synthétiser ni de faire d'hémisynthèse, en poursuivant les recherches avec le matériel adéquat, on pourrait l'extraire directement. Il n'existe pas encore de méthode à ce jour pour extraire l'osladine pure. Alors pourquoi est-il si difficile de se procurer cette molécule ?

De façon plus général, l'osladine est un puissant édulcorant non-utilisé dans l'industrie agroalimentaire et absente de nos supermarchés car elle se trouve en compétition avec d'autres édulcorants beaucoup plus performants : l'aspartame depuis la deuxième moitié du vingtième siècle puis plus récemment, des édulcorants naturels comme le stévioloside produit par la stévia. Cette plante est facile à cultiver et le stévioloside représente 5 à 15% du poids sec des feuilles et est 300 fois plus sucrant que le sucre lui-même donc à biomasse équivalente. La demande de ces édulcorants est grandissante notamment avec l'augmentation de pathologies liées à la malnutrition comme le diabète de type 2. La stévia est un édulcorant naturel parmi beaucoup d'autres comme le sirop d'agave, le xylitol (sucre de bouleau), fructose... Il existe aussi des édulcorants d'origine animale comme le tagatose, qui est extrait du lait de vache. Le marché des édulcorants est actuellement très saturé même si de nouvelles molécules apparaissent régulièrement (22).

Concernant l'osladine, elle est contenue très majoritairement dans le rhizome et à une très faible concentration (seulement 0,03% du poids sec) ce qui rend la culture du polypode beaucoup moins rentable que la culture de la stévia. D'autre part l'osladine a fait l'objet de la première synthèse totale d'une saponine, elle pourrait donc être produite industriellement.

Cependant sa mauvaise solubilité dans l'eau est un gros désavantage. Même si cette molécule présente un excellent indice glycémique, actuellement elle ne semble pas assez rentable pour l'industrie.

En 2018, la France était le premier producteur de sucre européen et le 9^{ème} producteur mondial. Les raisons de cette consommation sont multiples. Depuis la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, la consommation de sucre ne fait qu'augmenter dans nos boissons, desserts, gâteaux... en partie à cause des grandes marques responsables d'un marketing plus ou moins flou. On habitue de plus en plus tôt les enfants à la consommation de sucres souvent cachés. Boissons gazeuses, flocons d'avoine enrobés de sucre, pâte à tartiner. De plus, il suffit de regarder un aliment ou une boisson considérée comme « moins sucrée » pour se rendre compte que le sucre est juste remplacé par un autre édulcorant. (23)

Pour certaines marques de friandises par exemple, on rend le produit omniprésent, à la télévision, sur les publicités dans les arrêts de bus, dans de grands événements sportifs sponsorisés ou encore dans les distributeurs disposés un peu partout en ville. On cache le côté néfaste du produit en mettant en avant son goût sucré. On évite de parler de sa surconsommation et de ses effets pernicieux. Ils sont nombreux : obésité, diabète de type 2, caries dentaires, cancers... La liste est longue et la note sera salée à long terme. Ce marketing est finalement assez similaire à celui du tabac.

La consommation de sucre est essentielle, mais avec modération. Il ne faut pas s'en priver catégoriquement. C'est à ce niveau que le pharmacien d'officine peut intervenir. Les conseils hygiéno-diététiques font partie du cœur de métier des pharmaciens au même titre que la dispensation de médicaments. Le pharmacien est l'un des premiers interlocuteurs avec lequel le patient peut discuter de ses habitudes notamment alimentaires. Il ne sera pas là pour forcer le patient à changer du jour au lendemain mais peut l'accompagner l'encourager dans une démarche qui doit venir du patient. Cependant, la coordination avec les autres professionnels de santé est indispensable pour aider un patient à modifier son hygiène de vie et assurer le bon suivi.

Conclusion

Polypodium interjectum est une fougère assez peu connue par la population mais aussi dans le peu d'études que nous avons pu trouver. Ce qui a été une première difficulté pour nous. La deuxième a été l'obtention d'un témoin d'osladine que nous avons cherché plusieurs mois en vain. Nous avons essayé tout d'abord de la trouver dans les laboratoires spécialisés en témoins puis ceux en matières premières et enfin dans le commerce pour nous rendre compte que cette molécule n'était tout simplement pas commercialisée. Cela nous a intrigué et après ces quelques recherches nous avons enfin compris pourquoi l'osladine n'a pas percé le marché des édulcorants.

L'osladine semble être un édulcorant assez intéressant, en effet cette molécule présente plusieurs avantages. Elle est d'origine naturelle, ce qui est un gros point fort surtout en cette époque où on recherche de plus en plus à consommer des produits biologiques sains pour la santé. Grâce à son fort pouvoir sucrant, elle possède un excellent indice glycémique pour les personnes qui auraient besoin de réduire le sucre dans leur alimentation. Elle peut être extraite directement à partir de polypodes, pas besoin de faire de synthèse totale ou d'hémisynthèse. C'est un avantage mais aussi un inconvénient car son rendement est assez faible. De plus elle pousse souvent dans les bois et sous-bois, l'exploitation de cette plante serait plus compliquée que dans des plaines.

Dans la partie expérimentale de notre travail, le matériel dont nous disposions ne nous a pas permis de suivre à la lettre les protocoles décrits dans ces études et nous avons dû nous adapter. Le prélèvement des rhizomes, les manipulations effectuées ainsi que l'interprétation des résultats ont été faites méticuleusement mais l'absence de témoin nous conduit à interpréter nos résultats avec précaution.

Les recherches théoriques et pratiques autour de cette fougère ont été très intéressantes pour moi aussi bien au point de vue personnel que professionnel. Ces recherches autour de l'osladine, des fougères et des édulcorants me permettent de mieux comprendre ces sujets qui me seront utiles pour conseiller au mieux les patients à la pharmacie. Le fait d'avoir une partie expérimentale m'a permis d'aborder cette thèse avec un aspect pratique que je recherchais. A aucun moment je ne me suis senti lassé, la curiosité me donnait l'envie de creuser un peu plus loin, un peu plus profond à chaque nouvelle petite découverte. Par exemple c'est en effectuant mes recherches que j'ai appris que la molécule de phloroglucinol, le principe actif présent dans un médicament antispasmodique, est issu de la recherche sur la fougère mâle. J'ai aimé apprendre sur ce vaste sujet qu'est le polypode mais aussi la nature, seul ou avec les personnes qui m'ont encadré. Ces mêmes personnes que je remercie chaleureusement pour leur patience et conseils avisés. J'ai apprécié aussi me rendre sur le terrain, recueillir des échantillons de rhizomes de *Polypodium interjectum*, essayer de trouver une méthode d'extraction puis finalement la réaliser. Cependant les deux méthodes effectuées pendant cette thèse ne permettent pas d'extraire l'osladine seule et avec certitude, ce qui pourrait être l'objectif de futures recherches.

Pour conclure, je suis persuadé que les fougères restent des végétaux mystérieux qui ont encore beaucoup à offrir pour la science et l'être humain. On ne découvrira que pas à pas tout leur potentiel.

Références bibliographiques

1. Sigel EM, Windham MD, Haufler CH, Pryer KM. Phylogeny, Divergence Time Estimates, and Phylogeography of the Diploid Species of the *Polypodium vulgare* Complex (Polypodiaceae). *Systematic Botany*. 1 oct 2014;39(4):1042-55.
2. Prelli R, Boudrie M. Atlas écologique des fougères et plantes alliées: illustration et répartition des ptéridophytes de France. Paris: Lechevalier; 1992. 272 p.
3. Flore forestière française: guide écologique illustré. Nouvelle éd. Paris: Centre national de la propriété forestière, Institut pour le développement forestier; 2018.
4. BVcoursresume.pdf [Internet]. [cité 20 déc 2021]. Disponible sur: <http://nico8386.free.fr/cours/BA/BVcoursresume.pdf>
5. Média : Sporangies (coupes longitudinales) - Encyclopædia Universalis [Internet]. [cité 15 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/media/DE190193/>
6. Pojar J, MacKinnon A. Plants of the Pacific northwest coast: Washington, Oregon, British Columbia & Alaska. Revised ed. Vancouver: Lone Pine; 2004.
7. Newman E. A catalogue of British Ferns, including the Equisitaceae and Lycopodiaceae : intended for labels. [Internet]. London : Edward Newman,; 1845 [cité 2 janv 2022]. Disponible sur: <http://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/119990>
8. Les feuilles de Cyathea (black palm) - Les feuilles comestibles du Pacifique [Internet]. 2019 [cité 29 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=2yROEBz5IOU>
9. Coquillat M. Au sujet du « pain de fougère » en Maconnais. *linly*. 1950;19(7):173-6.
10. polypode.jpg (900×700) [Internet]. [cité 15 nov 2021]. Disponible sur: <http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/evolution/corbeille/rerelations-de-parente/comprendre/sporophytes-et-gametophytes/polypode.jpg>
11. Romieux Y. De la hune au mortier, ou, L'histoire des compagnies des Indes: leurs apothicaires et leurs remèdes. Nantes: Editions ACL; 1986. 440 p.
12. Jizba et Herout - isolation of constituents of common polypody rhizomes 1966.
13. Yamaide M, Ageta H. Yoko Arai, Motoko Yamaide, Sachiko Yamazaki, Hiroyuki Ageta - fern constituents: triterpenoids isolated from *Polypodium vulgare* P. *fauriei* and *P. virginianum* 1991. :9.
14. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human use - Assessment report on *Polypodium vulgare* L., rhizoma 2008. 2008;22.
15. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human use - Assessment report on *Polypodium vulgare* L., rhizoma 2008.
16. Gleńsk et al. - 2019 - Differing antibacterial and antibiofilm properties of *Polypodium vulgare* L. Rhizome aqueous extract and one of its purified active ingredients-osladin.
17. Reisch and Dawidar - 1978 - detection of Osladin in the Aerial parts of *Polypodium vulgare* L.
18. Simon A, Ványolós A, Béni Z, Dékány M, Tóth G, Báthori M. Ecdysteroids from *Polypodium vulgare* L. *Steroids*. 2011 Dec 11;76(13):1419-24. doi: 10.1016/j.steroids.2011.07.007. Epub 2011 Jul 22. PMID: 21803067.

19. Bagniewska-Zadworna A, Zenkteler E, Karolewski P, Zadworny M. Phenolic compound localisation in *Polypodium vulgare* L. rhizomes after mannitol-induced dehydration and controlled desiccation. *Plant Cell Rep.* juill 2008;27(7):1251-9.
20. Yamada et Nishizawa - 1993 - Total Synthesis of Intensely Sweet Saponin, Osladin.
21. Sardesai and Waldashan - 1991 - Natural and synthetic intense sweeteners.
22. Jean-Louis CUQ - 2012 - le goût sucré et les édulcorants intenses p.171-186.
23. Barkatou I. L'influence de l'industrie du sucre dans la recherche en santé. :91.
24. Oleszek - 2002 - Chromatographic determination of plant saponins.
25. Oleszek et Bialy - 2006 - Chromatographic determination of plant saponins—An update.
26. Caula - 1990 - *Polypodium phyllitidis* L. (Polypodiaceae) Un Helecho con elevada concentration de Sacarosa.
27. Jassim et Naji - 2003 - Novel antiviral agents a medicinal plant perspective.
28. Ványolós A. Investigation of plants containing unusual ecdysteroids with ring in their side-chain [Internet] [PhD]. [Szeged, Hungary]: Szegedi Tudományegyetem; 2012 [cité 2 nov 2021]. p. 1514. Disponible sur: <http://doktori.bibl.u-szeged.hu/1514/>
29. Zhang et al. - 2014 - Formal synthesis of osladin based on an activation relay process.
30. Yamada H, Nishizawa M. Synthetic approach to intensely sweet glycosides: Baiyunoside & Osladin. In: *Studies in Plant Science* [Internet]. Elsevier; 1999 [cité 2 nov 2021]. p. 360-72. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928342099800482>
31. Bassoli A, Borgonovo G, Morini G. Lost and found in sweeteners: forgotten molecules and unsolved problems in the chemistry of sweet compounds: Forgotten molecules in sweeteners chemistry. *Flavour Fragr J.* juill 2011;26(4):269-73.
32. Jones DL. *Encyclopedia of Ferns: An Introduction to Ferns, Their Structure, Biology, Economic Importance, Cultivation and Propagation*. New édition. Portland, Oregon: Timber Press; 1987. 450 p.
33. Hoshizaki BJ, Moran RC. *Fern grower's manual*. Portland, Or: Timber Press; 2002.

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Recherche de méthode d'extraction et dosage qualitatif de l'osladine à partir de rhizomes de *Polypodium interjectum* récoltés en Limousin

Les fougères sont des plantes très répandues en Europe ainsi que partout dans le monde. Le rhizome de fougère *Polypodium interjectum* possède un gout naturellement sucré. Ce gout est dû à une molécule nommée osladine. Cette molécule est présente dans les racines de polypode. Dans une première partie nous étudierons la fougère en général puis plus particulièrement *Polypodium interjectum*, une fougère très répandu notamment dans les bois en limousin. Ensuite nous recueillerons des échantillons de ses rhizomes afin de réaliser deux méthodes d'extractions qualitatives de la molécule d'osladine. Puis nous comparerons les deux méthodes dans le but de savoir laquelle serait la plus adaptée à l'extraction d'osladine à petite échelle puis nous conclurons sur sa faisabilité.

Mots-clés : Fougère, Polypode, osladine, racine, méthode, extraction

Research into an extraction method and qualitative determination of osladine from the root of *Polypodium interjectum* collected in Limousin

Ferns are very common plants in Europe as well as all over the world. *Polypodium interjectum* fern rhizome has a naturally sweet taste. This taste is due to a molecule called osladine. This molecule is present in the root of the polypods. In a first part, we study the fern in general then more particularly *Polypodium interjectum*, a fern very common in the woods in Limousin. Then we will collect samples of its rhizomes to compare two methods of qualitative extraction of this molecule. We want to know wich would be the most suitable on a small scale. Then we will conclude on its feasibility

Keywords : Fern, Polypode, osladin, root, method, extraction

