

## I Test d'humidité et séchage

La teneur en eau (le taux d'humidité) de la partie aérienne de *Cistus libanotis* L. a été déterminée sur trois échantillons de deux grammes (2 g) à 104 °C pendant 4 H (Tableau 13).

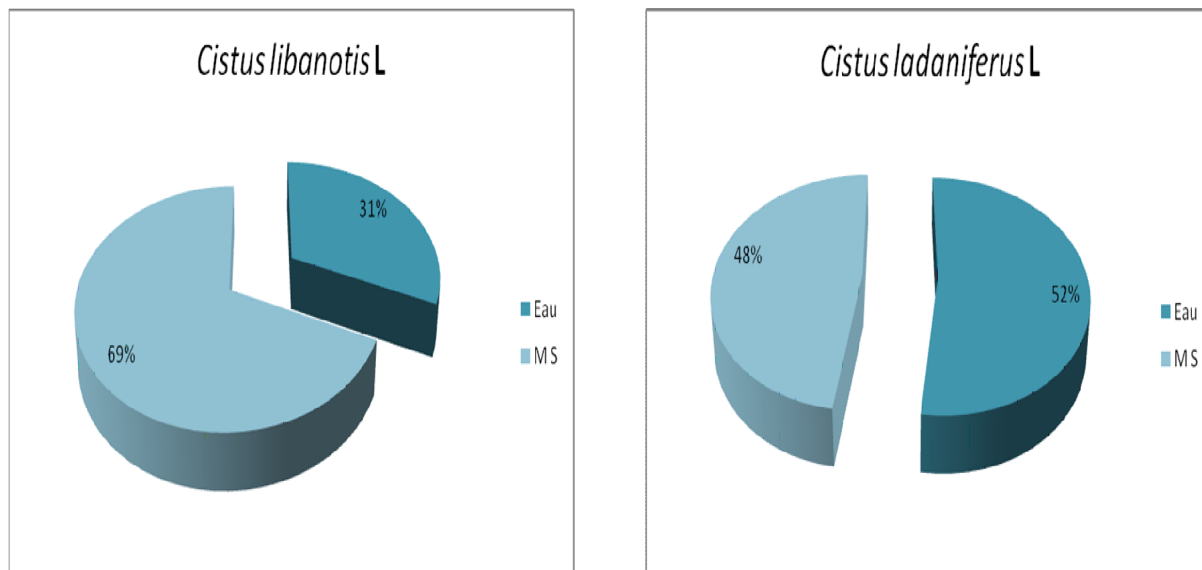
**Tableau 13** : Résultats du test d'humidité après séchage pendant 4 H à 104 °C.

Partie de la plante	Poids d'échantillons mf (g)	Poids d'échantillon sec ms (g)	Teneur en eau (%)	Moyen de taux d'humidité(%)
Partie aérienne	2	1,3684	31,58	31,45
	2	1,3334	33,33	
	2	1,4112	29,44	

L'analyse de notre échantillon montre un taux d'humidité relativement faible équivalent à 31,45 % ce qui représente approximativement le tiers (1/3) du poids de la plante fraîche (mf) est constitué par l'eau, les deux autres tiers (2/3) étant de la matière sèche (ms) (Figure 14).

Des études effectuées sur *Cistus ladaniferus* L. (Ciste de Tlemcen) à l'université de Tlemcen (Mohammedi, 2006) ont montrées que cette espèce comprend en poids approximativement des proportions équivalentes de matière sèche et d'eau. Le Ciste de Tlemcen (de la région de Sidi Mhamed) a un taux d'humidité (52,03%) supérieur à celui de *Cistus libanotis* L. (De la région d'El Hourane). Ceci peut être expliqué par les conditions climatiques qui caractérisent les deux régions : région de Sidi Mhamed, Tlemcen climat continentale et la région d'El Hourane de M'sila climat semi aride.

Ce paramètre a une grande importance pour l'extraction des polyphénols car sa présence est un élément gênant du rendement d'extraction. En effet c'est une source de dégradation des polyphénols (Cork et Krockenberger, 1991).



**Fig.14:** Teneur en eau (%) de la partie aérienne de *Cistus libanotis* L. et de *Cistus ladaniferus* L.

## II Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Les HE ont été extraites des matériaux végétaux secs par hydrodistillation, l'huile est séparée de l'eau par décantation (extraction liquide/ liquide) qui est réalisée à partir de deux liquides non miscibles, de différentes densité, qui forment deux phases par décantation. Le composé liquide à extraire doit être plus soluble dans le solvant d'extraction que dans le solvant de départ. Il est possible d'écrire la constante de partage apparente  $K_{app}$  du composé à extraire :

$$K_{app} = \frac{C_s}{C_a} \quad C_s : \text{Concentration du composé à extraire dans la phase organique.}$$

$$C_a : \text{Concentration du composé à extraire dans la phase aqueuse.}$$

Le solvant d'extraction utilisé est le cyclohexane, employé en raison de sa densité (0,778) proche de celle de l'HE des cistes (*Cistus ladaniferus* L. de la région de Sidi Mhamed =  $0,757 \pm 0,1051$ ). Et ceci à raison de 10 ml de solvant pour 100 ml de distillat. La densité relative de l'HE est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20 °C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20 °C (Afnor, 1992).

Le rendement en HE de notre plante d'étude *Cistus libanotis* L. de la wilaya de M'sila (station d'El Hourane) est exprimé soit : poids d'HE / poids de ms (p/p) ou volume d'HE / poids de ms (v/p).

Ainsi, un rendement de 0,5703 % (P/P) a été obtenu (Tableau 14).

**Tableau 14** : Résultats d'hydrodistillation.

La Plante	Rapports (%)	
	P/P (g/g)	V/P (ml/g)
<i>Cistus libanotis</i> L.	0,5703	0,600

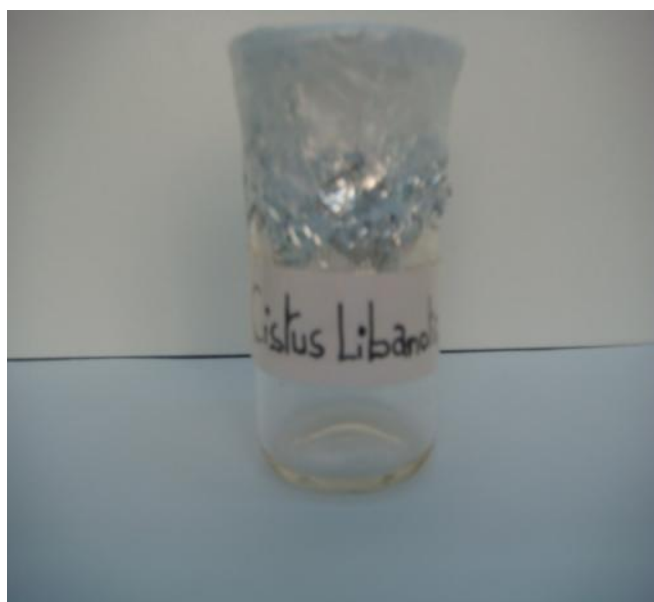
Ka d (2004) a obtenu une teneur en HE de *Cistus ladaniferus* L. de 0,36% (P/P) pour la station de Hafir et 0,13% (P/P) pour la station de Zarifet, notant que l'huile a été extraite par entraînement à la vapeur.

En comparant nos résultats avec ceux de Ka d (2004), on peut constater que *Cistus libanotis* L. (Figure 15) est plus riche en HE (le double) que *Cistus ladaniferus* L. de la station de Hafir, par contre le ciste de la station de Zarifet son rendement en HE est beaucoup plus faible (4 fois plus inférieur que celui de *Cistus libanotis* L). (Figure16)

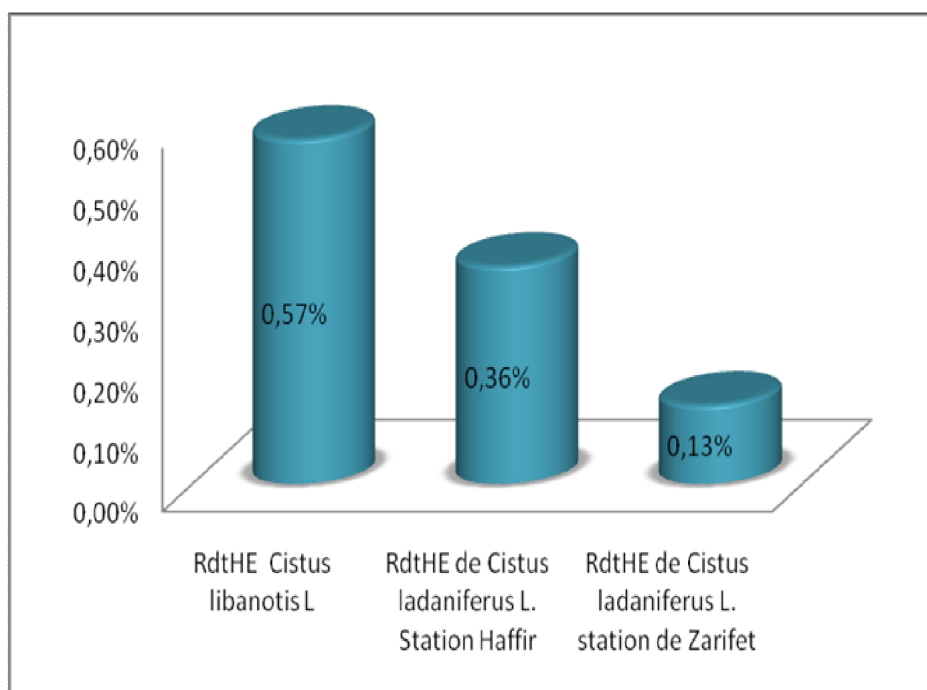
Cette différence peut être expliquée par la richesse du ciste de Tlemcen en eau (52,03 %) par rapport au *Cistus libanotis* L. dont sa teneur en eau est presque 2 fois plus inférieur (31,45 %).

Il est tout a fait clair que cette différence en teneur d'eau a une influence sur la composition de la plante en HE.

Le rendement en HE varie beaucoup avec la plante utilisée, le matériel employé pour l'extraction et la méthode d'extraction aussi bien l'origine de la plante.



**Fig.15** : L'huile essentielle de *Cistus libanotis* L.



**Fig.16** : Comparaison des rendements en HE des deux espèces du genre *Cistus*

### III Extraction des polyphénols totaux

#### III.1 Méthode d'extraction d'Akwuah et al. 2005

Les polyphénols sont une famille de composés très vaste, regroupant de substances de solubilité très hétérogène. En se référant à la méthode d'Akwuah et al. 2005, on a utilisé dans notre expérimentation cinq solvants de polarité différente : l'Eau, Méthanol 50%, Méthanol pur, Acétone 70% et Chloroforme.

Le tableau 15 donne les rendements en extraits polyphénolique brut (EPB) Exprimé en pourcentage de la matière sèche.

**Tableau 15:** Ensemble des résultats de l'extraction des EPB de *Cistus libanotis* L. (Akwuah et al., 2005).

Type de solvant	Poids d'échantillons sec (g)	Temps d'incubation(Heures)	Poids de l'extrait sec (g)	EPB (%).
Eau distillée	10	04	1,6684	16,684
	10	08	1,6814	16,814
Méthanol 50%	10	04	1,6944	13,665
	10	08	1,3665	16,944
Méthanol Pur	10	04	1,2488	12,488
	10	08	1,8787	18,787
Acétone 70%	10	04	2,1649	15,441
	10	08	1,5441	21,949
Chloroforme	10	04	1,1231	11,231
	10	08	1,1139	11,139

Les résultats exprimés en pourcentage de la matière sèche (Figure 17) montrent que :

- Le meilleur rendement (21,949 %) est obtenu par l'acétone 70% avec un temps d'incubation de 8 H.

Des études très récentes réalisées par Andrade et al. (2009) sur *Cistus ladaniferus* L., ont obtenu un rendement de 14,19% (p/p) avec l'acétone pur qui correspond à  $334,46 \pm 31,83$  mg de polyphénols totaux exprimés en unité d'acide gallique /g de plante. En comparaison ces deux espèces (Figure 18). on peut constater que *Cistus libanotis* L. contient un total de composés phénolique largement supérieur à  $334,46 \pm 31,83$  mg d'acide gallique /g de la plante.

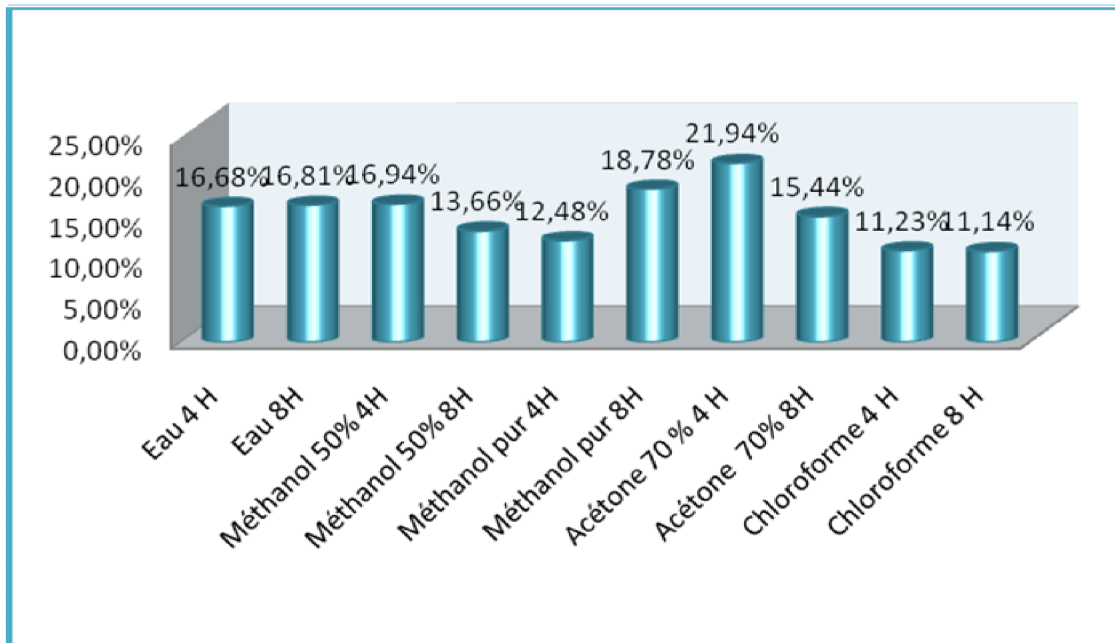
• Les plus faibles rendements ont été obtenus respectivement avec le chloroforme, pour les deux durées d'incubation de 4 et 8 H 11,139% et 11,231% respectivement.

Dans cette méthode, les extractions ont été réalisées pour deux durées d'incubation 4 et 8 H. Selon les résultats obtenus, on peut dire que les rendements d'extraction avec les différents solvants à des durées d'incubation de 8 H sont supérieurs à ceux de 4H, qui peuvent être expliqués de fait que 8 H sont suffisantes pour extraire tous les composés phénoliques présents dans la plante de telle façon que la matière végétale soit totalement épuisée.

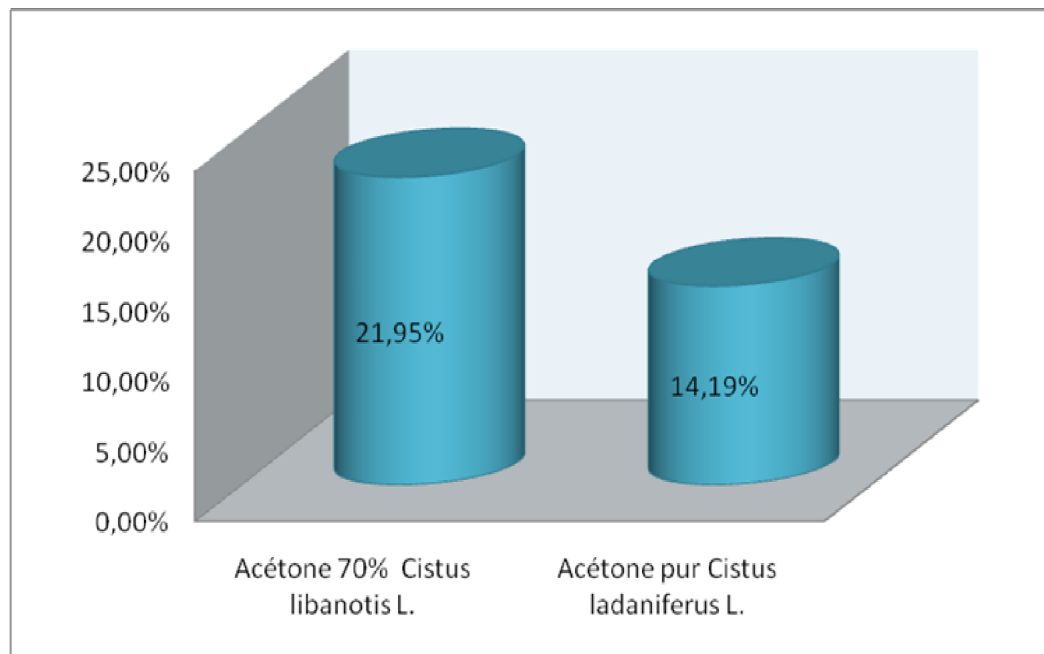
Ces résultats peuvent être expliqués par la solubilité différentielle des différents composés phénoliques où les polyphénols polaires sont solubles dans les solvants polaires et les polyphénols apolaires sont solubles dans les solvants apolaires.

La lecture des résultats (rendements d'extraction), nous permet de constater que le plus grand rendement a été obtenu avec l'acétone 70%, cependant, les rendements obtenus avec les autres solvants (polaires et apolaires) varient de 16,814% avec l'eau jusqu'à 18,787% pour le méthanol pur et ceci pour l'extrait de 8H.

Il apparaît tout à fait clair, que notre plante d'étude *Cistus libanotis* L. contient aussi bien des polyphénols polaires qu'apolaires.



**Fig.17:** Rendements d'extraction en fonction du type de solvant et du temps d'extraction de la partie aérienne de *Cistus libanotis* L.



**Fig.18:** Comparaison des rendements d'extraction par l'acétone pur et l'acétone 70% des deux espèces.

### III.2 Méthode d'extraction d'Owen et Johns (1999)

Les rendements en EPB, exprimés en pourcentage de la matière sèche obtenus par la méthode d'Owens et Johns (1999) sont regroupés dans le tableau 16.

**Tableau 16:** Rendements en extraits méthanolique (EPB) de la partie aérienne de *Cistus libanotis* L (Owen et John , 1999)

Partie utilisée de la plante	Poids de l'échantillon (g)	Température d'évaporation (° C)	Poids de l'extrait sec après évaporation (g).	EPB (%).
Partie aérienne	0,200	55	0,0509	25,45

Le solvant utilisé est le méthanol pur (99%), car il possède l'avantage d'être plus facilement éliminé, dans le cas où l'on veut concentrer l'extrait sous vide (Ribereau -gayon., 1968) et donne généralement de meilleurs rendements d'extraction (Vercauteren et al., 1968 ; Cowen., 1999).

La masse de l'extrait sec de la partie aérienne de *Cistus libanotis* L. est 0,0509 g pour 0,200 g de poudre sèche, soit un rendement de 25,45% (figure 19), ce qui confirme les résultats obtenus par la méthode d'Akwuah et al. (2005) qui a montré la richesse de la partie aérienne en polyphénols.

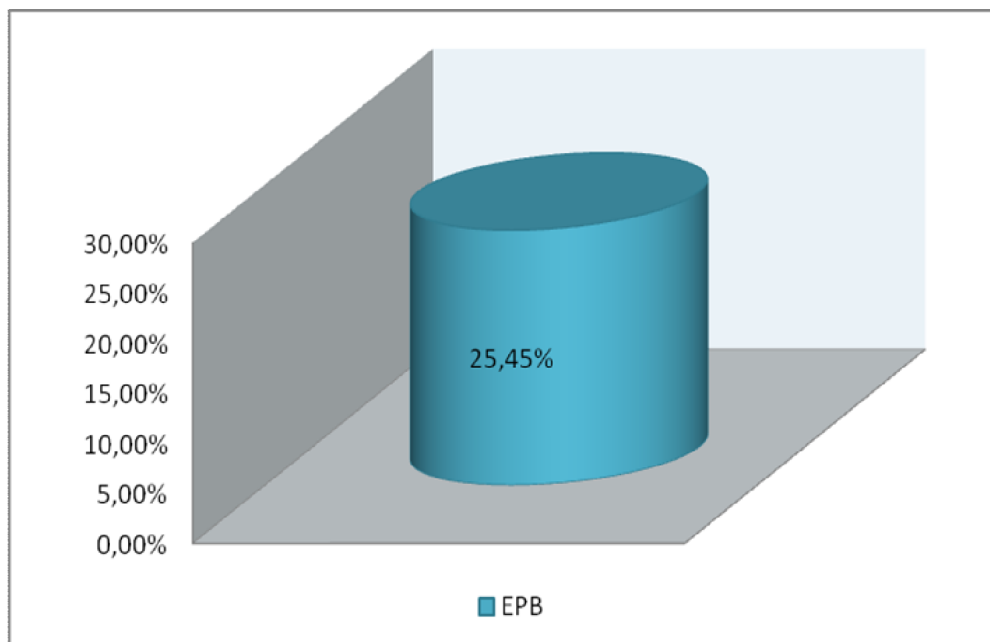
Les résultats des deux méthodes d'extraction montrent que d'une manière générale le rendement d'extraction de la deuxième méthode avec le méthanol pur est élevé que celui de la première méthode (Figure 20).

Pour une extraction de 168 H (une semaine) avec le méthanol pur le rendement est de 25,45 %

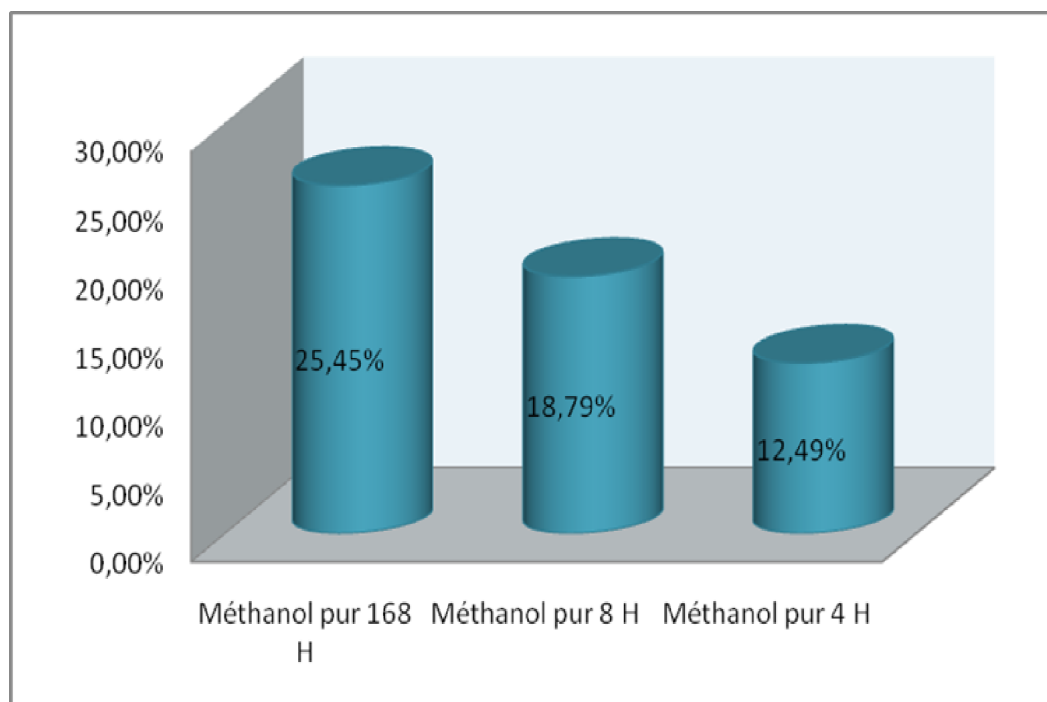
Ceci peut être expliqué par :

- Nature du solvant d'extraction : méthanol pur.
- Le temps d'extraction : 168 H (une semaine).
- Le rapport masse/solvant : 200 mg / 500 ml de solvant.
- Condition d'extraction : agitation continue qui permet une meilleure infiltration du solvant.

Notre plante d'étude est riche en polyphénols ce qui peut être confirmé ultérieurement par leurs dosage.



**Fig.19:** Rendement d'extraction en EPB par la méthode d'Owen et Johns (1999).



**Fig.20:** Comparaison des rendements d'extraction entre deux méthodes avec le méthanol pur.

### III.3 Extraction des flavonoïdes

Les différentes fractions de flavonoïdes récupérés après évaporation à sec, et sous pression réduite, ont été pesées pour déterminer leurs poids sec, les rendements ont été déterminés par rapport à 20 g de matériel végétal sec; rendu en poudre; subissant une extraction douce. Les résultats ont été exprimés en pourcentage (p/p) de la matière sèche (tableau17).

**Tableau 17** : Rendements en flavonoïdes totaux de la partie aérienne de *Cistus libanotis* L.

La phase récupérée	Type de flavonoides	Rendement (fraction / flavonoides totaux) (%)	Rendement ms (%) p/p	Rendement (Flavonoides totaux /ms) (%)
Phase aqueuse	Flavonoides di-tri et tétra-glycosidiques	90,538	16, 222	
Phase organique de chloroforme	Flavonoides aglycones	5,344	0,9575	17,915
Phase organique d'Acétate d'éthyl	Flavonoides mono et di-glycosidique	4,116	0,7375	

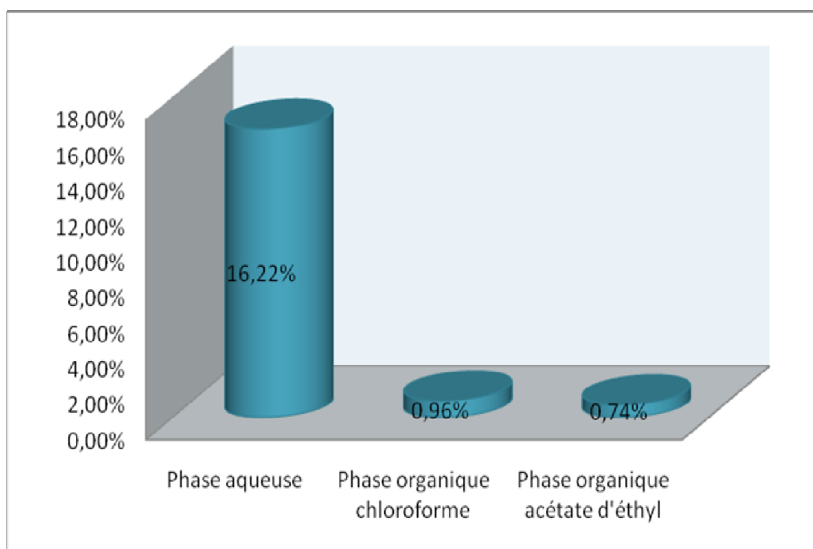
Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, les rendements dépendent de la méthode et des conditions d'extraction. La méthode d'extraction conditionne également le contenu total en flavonoïdes (Lee et al., 2003).

D'après les résultats résumés dans le tableau 17, en effet, les rendements d'extraction sont relativement élevés, ce qui indique la richesse de *Cistus libanotis* L. en flavonoïdes. Le plus grand rendement est obtenu dans la fraction aqueuse (16,222%) (Figure 21) qui représente également

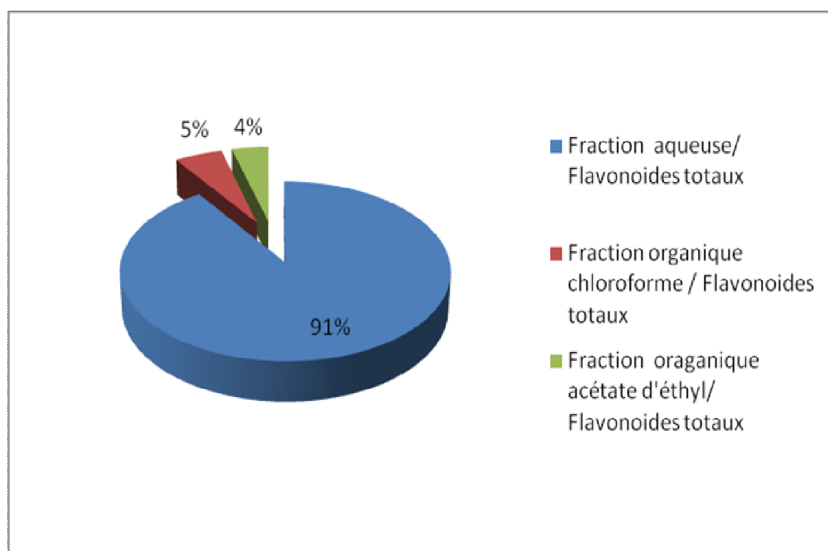
90,538% par rapport aux flavonoïdes totaux tandis-que les deux autres phases organique (chloroforme et acétate d'éthyl) ont respectivement des rendements de 0,9575% et 0,7375% (par rapport aux flavonoïdes totaux, dans le premier cas représente 5,344 % et le second 4,116 % (Figure 22).

L'extraction des flavonoïdes a partir de *Cistus ladaniferus* L. par l'acétone et l'éthanol ont données deux fractions dont les rendements sont 14,19% et 8,49%.

La phase organique (acétone) est largement supérieur que celle de la fraction organique (chloroforme et acétate d'éthyl) de *Cistus libanotis* L. dont le rendement est de 1,695 % .Par contre la fraction aqueuse (16,222%) de l'espèce d'étude est deux fois plus grande que le rendement de la fraction éthanolique de *Cistus ladaniferus* L.



**Fig.21:** Expression des rendements des différentes fractions flavonoïdes.






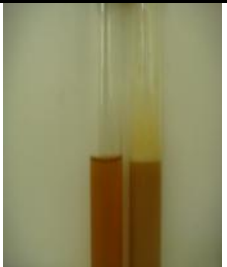
**Fig.22 :**Répartition des différentes fractions de *Cistus libanotis* L.

#### IV Tests de mise en évidence de quelques substances actives

Tous les essais phytochimiques que nous avons effectués s'inspirent de ceux décrits par Faugeras et Lavenir (1965). Ce sont des réactions colorimétriques qui résultent de l'interaction des fonctions présentes dans la structure de chaque constituant végétal avec les groupes chimiques présents dans les solutions utilisées pour la mise en évidence.

Les essais sont effectués sur un infusé de 10 g de *Cistus libanotis* L. rendu en poudre dans 100 ml d'eau distillée. Les résultats des tests sont résumés dans le tableau 18.

**Tableau 18 :** Résultats de la mise en évidence de quelques classes de métabolites secondaires .

Principe actif	Polyphénols	Anthocyanes	Tanins	Saponosides	Coumarines
Réactif	HCl	NH <sub>4</sub>	Fe <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	NaOH
Résultats	+++	++	++++	+++	-
Photo					/

Les tests phytochimiques permettent d'avoir une idée générale sur les différentes familles de composés qui forment *Cistus libanotis* L.

Ainsi, le test à chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) a montré la très grande richesse de *Cistus libanotis* L. en tanins (tableau 18) ou on a constaté une couleur bleue nuit très intense montrant la forte teneur de la plante en tanins.

Le test à l'acide chlorhydrique (HCl) a montré clairement la présence de polyphénols en quantité appréciable ce qui a été constaté préalablement lors de leur extraction par les différentes méthodes.

En outre, on remarque aussi la richesse de la plante en saponosides ou la hauteur de la mousse a dépassé le 1,5 cm. Par contre, le test à l'ammoniac (NH<sub>4</sub>) révèle la faible teneur de

*Cistus libanitis* L. en anthocyanes. En fin un test à l'hydroxyde de sodium (NaOH) a donné un résultat négatif signifiant l'absence de coumarines de l'espèce de Ciste étudiée .

#### **V Les séparations chromatographiques des extraits méthanoliques sur couche mince (CCM)**

Une séparation par CCM commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, la dimension de la cuve et le degré de saturation de la chambre de développement par les vapeurs solvants. Tous ces facteurs conditionnent de pré la séparation (Yrjönen, 2004).

Huit systèmes de solvant choisis à partir de la littérature ; les chromatogrammes résultants comportent une série de spots . L'identification des composés est basée sur la comparaison des RF et des couleurs observées, sous lampe UV, des taches apparues avec ceux des étalons (acide gallique et la quercétine), portés dans les mêmes conditions expérimentales.

Suite au nombre réduit des étalons disponibles, pour certains, on s'est arrêté à l'identification de la classe phénolique en se basant sur les données de la bibliographie (tableaux 19,20).

#### **Les données de la bibliographie**

Les polyphénols sont une famille constituée d'environ 8000 composées, divisés en plusieurs catégories (Edeas) avec un comportement chromatographique différent en CCM (migration et révélation sous-UV).

**Tableau 19:** Composés phénoliques identifiés par CCM (Markham,1982).

Couleurs sous UV 366 nm	Classe de polyphénols /Flavonoïdes possibles (Markham.1982)	Composés probables
Mauve	Anthocyanidine-3-glycosides	
Violet	Flavones	
Bleu	Ac Phénol	
Bleu vif	Ac Phénol	
Bleu jaunâtre	/	
Bleu blanc fluorescent	Flavonols, Flavones, Isoflavones et Flavanones.	
Bleu pale	Ac Phénol	
Vert	Flavonols, Flavonones et Aurones	
Jaune	Flavonols	
Jaune grisâtre	/	Rutine
Jaune pale	Flavonols	
Orange	Anthocyanidine-3-glycoside	
Rouge	Anthocyanidine-3-glycoside	
Rouge vif	Anthocyanidine-3-glycoside	
Gris	/	
Gris sombre	/	
Bleu sombre	/	Catéchol
Rose	Anthocyanidine-3,5-diglycosides Anthocyanidine-3,5-diglycosides	
Rose pale		

**Tableau 20 :** Révélation des flavonoïdes après séparation CCM.

UV 366 nm	Révélation AlCl <sub>3</sub> /UV 366 nm	Type de phénol ou de Flavonoïde possible
Couleur	Couleur	
Rouge	Orange	Anthocyanidine-3-glycoside
Jaune	Orange	Flavonols
Jaune pale	Jaune pale	Flavonols
Bleu blanc fluorescent	Orange	Ac Phénol
Bleu blanc fluorescent	Bleu clair	Flavonols, Flavones, Isoflavones et Flavanones.
Pourpre sombre	Jaune	Flavonols, Flavones, Isoflavones et Chalcones.

La CCM n'est pas suffisante à elle seule pour identifier d'une manière précise un produit mais apporte des renseignements susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structure, par exemple: une fluorescence, une coloration ou la mesure d'un rapport frontal (RF). Les rapports frontaux sont calculés comme suit :


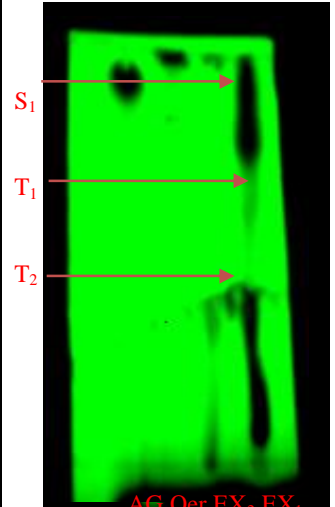
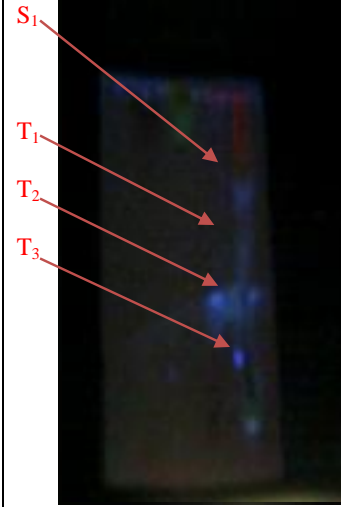

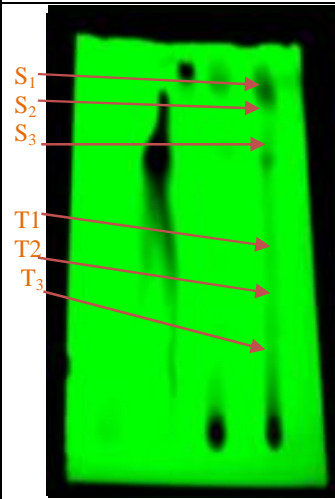
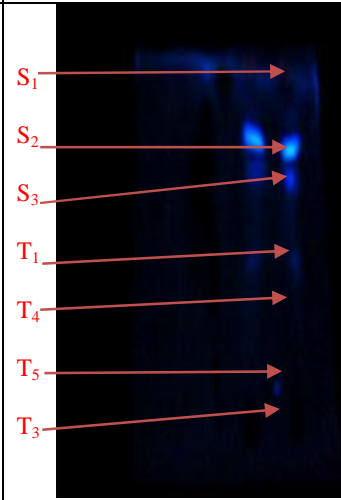
$$\mathbf{Rf} = \frac{d}{D}$$

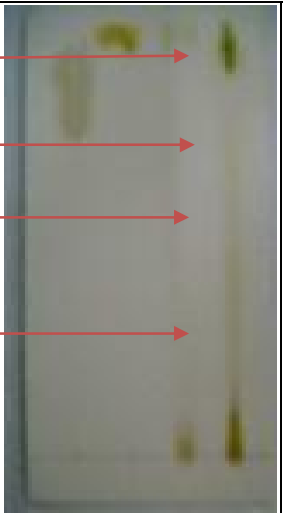
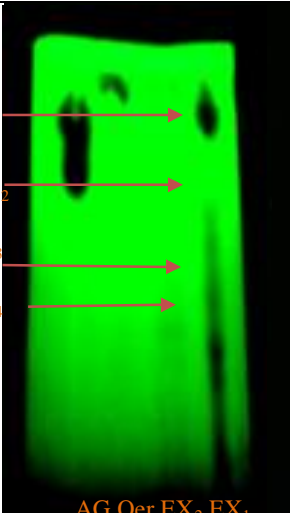
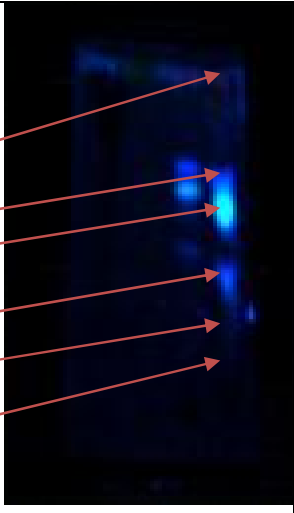
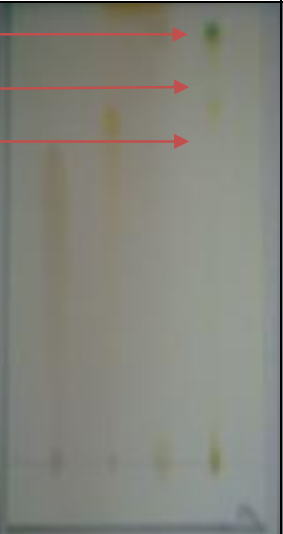
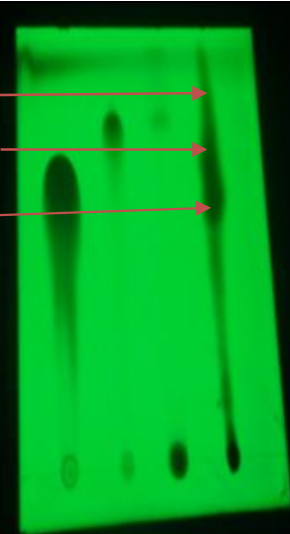

d : Distance parcourue par la tache.


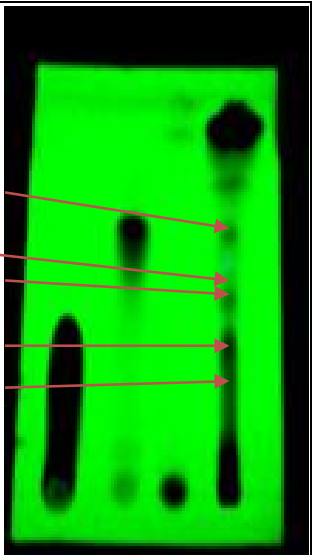
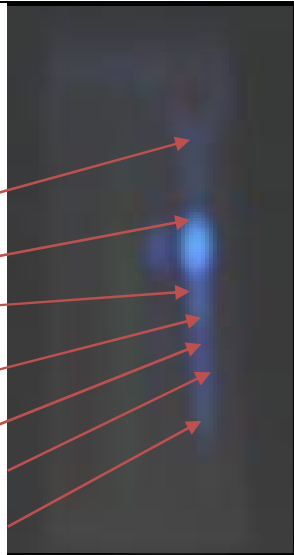

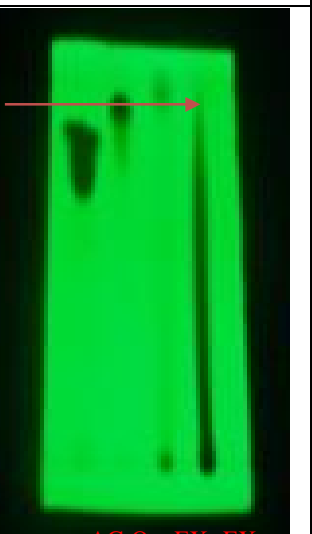
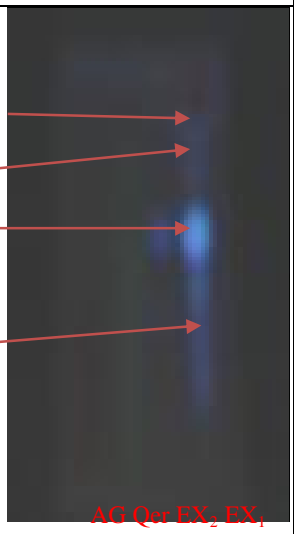
D : Front de solvant.

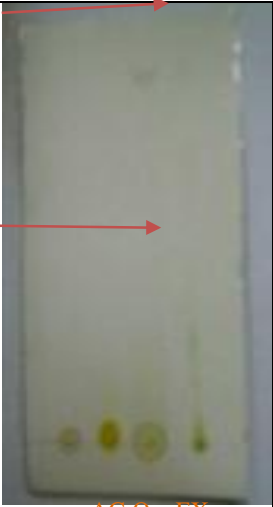
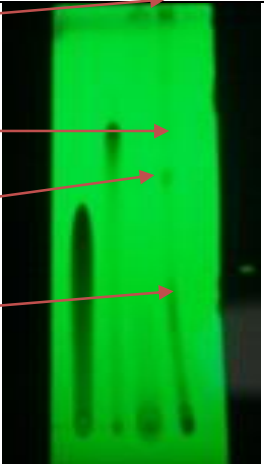

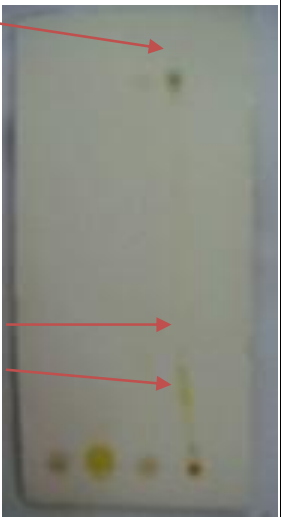
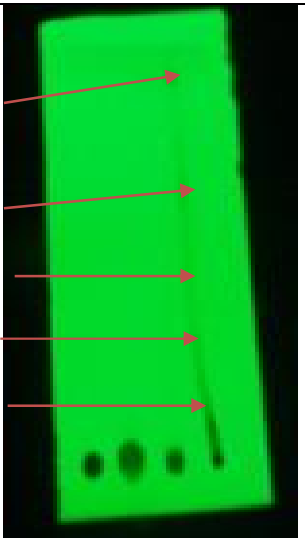

Une fois l'éluion est achevée, les plaques sont ressorties de la cuve ,séchées puis mises dans une chambre noire d'une CCM de haute performance HPTLC (Camag) pour être observées sous UV, à 254 et à 366 nm. (Tableau.21).

Tableau.21 : Résultats de séparation CCM.

Système solvant	Observation à L'œil nu		Observation sous UV	
		RF (cm)	A 254 nm	A 366 nm
AAE (8/1/1)		$S_1=0,97$		
AME (7/1,5/1,5)		$S_1=0,96$ $S_2=0,90$ $S_3=0,56$		

<p>AFE (8/1/1)</p>	 <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	<p><math>S_1=0,92</math> <math>S_2=0,77</math> <math>=0,44</math> <math>S_4=0,11</math></p>	 <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	 <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>
<p>AE (2/8)</p>	 <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>		 <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	 <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>

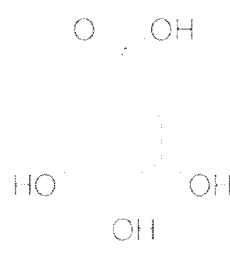
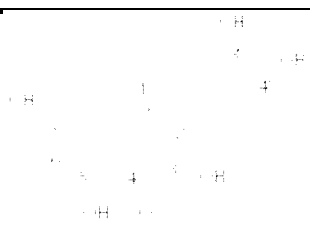
<p>CM (10/2)</p>	 <p>S<sub>1</sub> S<sub>2</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	<p>S<sub>1</sub>=0,85 S<sub>2</sub>=0,67</p>	 <p>S<sub>1</sub> T<sub>1</sub> S<sub>2</sub> T<sub>2</sub> T<sub>3</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	 <p>S<sub>1</sub> T<sub>1</sub> S<sub>2</sub> T<sub>2</sub> T<sub>3</sub> T<sub>4</sub> T<sub>5</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>
<p>AB (9/1)</p>	 <p>S<sub>1</sub> S<sub>2</sub> S<sub>3</sub> S<sub>4</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	<p>S<sub>1</sub>=0,97 S<sub>2</sub>=0,91 S<sub>3</sub>=0,78 S<sub>4</sub>=0,57</p>	 <p>S<sub>1</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	 <p>S<sub>1</sub> S<sub>2</sub> S<sub>3</sub> S<sub>4</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>

<p>DM (5/1)</p>	 <p>S<sub>1</sub></p> <p>S<sub>2</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	<p><math>S_1=0,94</math> <math>S_2=0,32</math></p>	 <p>S<sub>1</sub></p> <p>T<sub>1</sub></p> <p>T<sub>2</sub></p> <p>T<sub>3</sub></p> <p>S<sub>2</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	 <p>S<sub>1</sub></p> <p>T<sub>1</sub></p> <p>T<sub>2</sub></p> <p>T<sub>3</sub></p> <p>S<sub>2</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>
<p>DA (9/1)</p>	 <p>S<sub>1</sub></p> <p>S<sub>2</sub></p> <p>S<sub>3</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	<p><math>S_1=0,06</math> <math>S_2=0,25</math> <math>S_3=0,97</math></p>	 <p>S<sub>1</sub></p> <p>T<sub>1</sub></p> <p>T<sub>2</sub></p> <p>S<sub>2</sub></p> <p>S<sub>3</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>	 <p>S<sub>1</sub></p> <p>T<sub>1</sub></p> <p>T<sub>2</sub></p> <p>S<sub>2</sub></p> <p>S<sub>3</sub></p> <p>AG Qer EX<sub>2</sub> EX<sub>1</sub></p>

L'observation des plaques de CCM a montré la présence de plusieurs taches plus en moins distinctes et qui diffèrent d'un système solvant à l'autre (polaire ou apolaire), les distances de migration des taches nous permettent de mesurer les RF et les comparer avec ceux des témoins.

Deux témoins ont été utilisés, acide gallique et la quercétine, en raison de leur disponibilité et puisqu'ils représentent deux classes majeures de polyphénols (tableau 22).

**Tableau.22:** propriétés physico-chimiques des étalons.

Les Témoins	Le poids moléculaire (g/ mol)	La classe	La formule Brute	Apparence	La structure
L'acide gallique	170,1195	Tanin	$C_7H_6O_5$	Cristaux blancs, hygroscopiques	
Quercétine	302,2357	Flavonoides (Flavonol)	$C_{15}H_{10}O_7$	Poudre jaune	

#### Comparaison aux étalons :

Les taches observées après élution des plaques par les six systèmes solvants suivants : CM (10/2), AM (7/1,5/1,5), AB (9/1), AE (2/8), DM (5/1) et AFE (8/1/1) présentent des RF égaux à ceux de la quercétine et l'acide gallique ce qui confirme la présence de ces derniers dans l'extrait méthanolique.

Dans la plaque éluee par le système DA (9/1), une seule tache présente un RF égal à celui de la quercétine, ce qui indique la solubilité de cette dernière dans ce système solvant.

Pour le système AAE (8/1/1), aucune tache n'a un  $R_f$  égal à ceux des témoins donc la quercétine et l'acide gallique ne sont pas solubles dans ce système.

Le but de CCM n'est pas l'identification des composés, mais la mise en évidence de différentes classes de substances polyphénoliques probables appartenant à cette grande famille très hétérogène. (Le tableau 23) résume les résultats de la séparation des extraits méthanoliques bruts en utilisant les différents systèmes solvants.

**Tableau 23:** Résultats de la CCM sous UV et leurs interprétations.

Systèmes solvants	254 nm	UV		Composés probables (Markham, 1982)
		spots	366 nm	
CM (10/2)	4 taches sombres et une tache bleue claire	S <sub>1</sub>		
		T <sub>1</sub>	-Violet -Sombre	-Flavones /
		S <sub>2</sub>	-Vert clair	-Flavonols, Flavanones et Aurones
		T <sub>2</sub>		-Flavonones -Ac phénol
		T <sub>3</sub>	-Violet -Bleu clair	/
		T <sub>4</sub>	-Sombre -Rouge orangé	- Anthocyanidine-3- glycoside
		T <sub>5</sub>		
AME (7/1.5/1.5)	6 taches sombres (5 taches de taille moyenne et la sixième plus grande).	S <sub>1</sub>	-Sombre -Bleu clair fluorescent	-Flavonols, Flavanones et isoflavanones
		S <sub>2</sub>	-Sombre -Vert clair	/
		S <sub>3</sub>	fluorescent	- Flavonols, Flavanones et Aurones
		T <sub>1</sub>	-Violet fluorescent	-Flavones
		T <sub>4</sub>	- Bleu clair fluorescent	- Flavonols, Flavanones et Aurones
		T <sub>5</sub>		/
		T <sub>3</sub>	-Sombre -Vert clair -Rouge	- Anthocyanidine-3- glycoside -/ Anthocyanidine-3- glycoside
AB (9/1)	Une seule tache sombre en forme fusitive	S <sub>1</sub>	-Orange	-Anthocyanidine-3- glycoside
		S <sub>2</sub>	-Jaune	-Flavonols
		S <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	-Rose pale fluorescent	-Anthocyanidine-3- glycoside
			-Tache clair	/

AAE (8/1/1)	6 taches sombres (ne sont pas bien distinctes chaque deux a part)	S <sub>1</sub>	-Clair	/
		T <sub>1</sub>	-Vet fluorescent	- Flavonols, Flavanones et Aurones
		T <sub>2</sub>		/
		T <sub>3</sub>	-Sombre -Rouge clair	- Anthocyanidine-3- glycoside
AE (2/8)	03 taches sombres (la deuxième et la troisième tache ne sont pas bien distinctes , d'une grande taille en forme de fusée.	S <sub>1</sub>	-Marron foncé	/
		S <sub>2</sub>	-Orange clair fluorescent	-Anthocyanidine-3- glycoside
		S <sub>3</sub>	-Marron foncé	/
		S <sub>4</sub>	-Rouge	- Anthocyanidine-3- glycoside
		S <sub>5</sub>		
		S <sub>6</sub>	-Rose fluorescent	- Anthocyanidine-3,5 diglycoside
DM (5/1)	06 taches (03 taches sombres, circulaire, une tache bleue claire centrée ,02 plus grandes taches sombres situées à l'extrémité.	S <sub>1</sub>	-Marron	/
		T <sub>1</sub>	-Clair	/
		T <sub>2</sub>	-Marron	-Flavones
		T <sub>3</sub>	-Violet clair fluorescent	-Tanins
		S <sub>2</sub>	-Gris fluorescent	-Flavones
		T <sub>1</sub>	-Violet fluorescent	
		T <sub>2</sub>	-Bleu clair fluorescent	-Ac Phénol
		S <sub>2</sub>	-Rose	- Anthocyanidine-3,5 diglycoside
DA (9/1)	05 taches (02 taches sombres apparentes ,03 taches moins observables)	S <sub>1</sub>	-Marron	/
		T <sub>1</sub>	-Rouge	- Anthocyanidine-3- glycoside
		T <sub>2</sub>	-Rose foncé	- Anthocyanidine-3,5 diglycoside
		S <sub>2</sub>	-Marron clair	/
		S <sub>3</sub>	-Marron foncé	/
		T <sub>1</sub>	-Rose clair fluorescent	- Anthocyanidine-3,5 diglycoside
		T <sub>2</sub>	-Sombre	/
		S <sub>2</sub>	-Clair	-Flavones
AFE (8/1/1)	04 taches (03 taches sombres de taille moyenne et une tache bleue claire	S <sub>1</sub>	-Violet foncé fluorescent	/
		S <sub>2</sub>	-Sombre	- Flavonols, Flavanones et Aurones
		S <sub>3</sub>	-Violet fluorescent	-Flavones
		S <sub>4</sub>	-Sombre	/
		S <sub>5</sub>	-Bleu clair	-Ac Phénol
		S <sub>6</sub>	-Bleu foncé	-Ac Phénol
		S <sub>3</sub>	-Sombre	/
		S <sub>6</sub>	-Rouge	- Anthocyanidine-3- glycoside

**Observation à 254 nm**

Pour les différents systèmes de solvants, on a observé certains nombres de taches qui diffèrent par leurs nombres, leurs tailles et leurs couleurs (qui sont généralement sombre).

- **Pour les systèmes AME ( 7,1.5, 1,5) , DM (5/1) et AAE (8/1/1) ,** On a observé 6 taches sombres:

- Dans le premier système, les 5 premières taches sont d'une taille moyenne alors que la sixième est plus grande .

- Avec le DM (5/1): 5 taches sombres , les 3 premières sont circulaires de taille moyenne .

- Pour le troisième AAE (8/1/1) : chaque 2 taches sont attachées de sont de grandes tailles .

- **Pour les systèmes CM (10/2) , DA (9/1) ,** On a observé 5 taches.

- Avec le premier CM (10/2): 5 taches sombres .

- Le second DA(9/1) : 2 taches sombres bien apparentes et 3 taches moins observables .

- **Pour le système AFE (8/1/1):** on a obtenu 4 taches sombres de taille moyenne.

- **Pour le système AB (9/1):** on a obtenu une seule tache sombre , un peu large a sa base en forme de fusée ce qui ne permet la détermination de son RF.

- **Pour le système AE (2/8):** on a constaté la présence de 3 taches sombres dont la deuxième et la troisième ne sont pas bien distinctes, de grandes tailles et en forme de fusée .

**Observation à 366 nm :**

L'observation à 366 nm nous permet de bien distinguer les taches et leurs couleurs et donc prédire les composés les plus probables qui entrent dans la composition de l'extrait méthanolique de *Cistus libanotis* L.(Tableau 23).

- **Le système CM (10/2) :** a permis l'apparence de 5 taches de couleurs différentes : violet, vert clair ,bleu clair, rouge orangé qui correspondent aux flavones,flavonols, flavanones, auronnes, acide phénol, anthocyanidine3-glycoside. En plus, on a remarqué la présence de deux autres taches sombres (non identifiées).
- **Le système AME (7/1,5/1,5):** a permis la mise en évidence 7 taches dont 5 ont la même couleur de celle apparues dans le système précédent ( CM 10/2) qui sont le violet , 2 taches vertes claires et 2 rouges qui correspondent aux flavones , flavonols ,flavanones, auronnes et anthocyanidines 3- glycoside . Les autres taches, n'ont pas éluées par le CM, qui sont de

couleure : bleue claire fluoréscante et qui correspondent aux flavonols, flavones, isoflavones et flavanones, avec 4 taches sombres ont été aussi observées .

- **Le système AB (9/1):** a permis de visualiser 4 taches qui ne sont pas éluées par les 2 premiers systèmes ( CM et AME ) de couleurs : orange , jaune , rose pal fluoréscant et une tache claire qui correspondent aux anthocyanidines 3- glycoside, flavonols et anthocyanidine 3-5 diglycosides.
- **Le système AAE (8/1/1):** a permis la mise en évidence 4 taches : une claire , verte fluoréscante, sombre, rouge clair .Les taches: verte fluoréscante et rouge clair, déjà apparues dans les deux premiers systèmes CM et AME, correspondant aux : flavonols, auronnes ,flavanones et anthocyanidine 3- glycoside.
- **Le système AE (2/8):** fait apparaître 5 taches dont 3 sont similaires a celles observés avec les 4 systèmes précédents (CM , AME, AB, AAE) qui sont orange clair fluoréscant , rouge , rose fluoréscant qui correspondent aux anthocyanidines 3- glycoside, anthocyanidine 3-5 diglycosides, les 2 taches marron foncé ne sont pas identifiées.
- **Le système DM:** permet de visualiser 11 taches parmi lesquelles le gris fluoréscant qui n'est pas élué par les systèmes précédents et qui correspond aux tanins, les 06 taches de couleurs : violet clair fluoréscant, violet fluoréscant , bleu clair fluoréscant, rose, rouge et enfin 3 taches marron correspondent aux flavones, acide phénol,anthocyanidines 3,5-diglycoside , anthocyanidine 3-glycoside et une tache claire.

•**Le système DA (9/1):** fait apparaître 09 taches , déjà observées avec les 06 systèmes précédents, 02 couleurs: rose foncé,marron clair,marron foncé,rose clair fluoréscant, 2 sombres, clair,violet foncé fluoréscant, rouge et qui correspondent aux anthocyanidine -3,5 diglycoside, flavones , anthocyanidine 3- glycoside.

•**Le système AFE (8/1/1) :** permet de mettre en évidence 7 taches, déjà observées avec les systèmes précédents, de couleurs : vert foncé, violet fluoréscant, bleu clair , bleu foncé, rouge et sombre (02 taches) qui correspondent aux flavonols , flavanones , auronnes , flavones, acide phénol et anthocyanidine 3- glycoside.

### Comparaison des résultats de séparation sur CCM de deux espèces du genre *Cistus* (*Cistus libanotis* L et *Cistus ladaniferus* L.)

La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par l'étude phytochimique de *Cistus ladaniferus* L. de la région de Tlemcen (Mohammedi., 2006), où l'extrait de cette plante a été élué par 3 systèmes solvants dont on choisie le système (chloroforme/méthanol/eau 90/10/5) qui est très proche à de nos systèmes solvants en occurrence chloroforme /méthanol (10/2) (Tableau 24).

**Tableau.24:** Comparaison des résultats de CCM de deux espèces *Cistus libanotis* L et *Cistus ladaniferus* L.

Extrait	Système solvant CME (90/10/5)		Extrait	Système solvant CM (10/2)	
	Couleur sous lampe UV 366 nm	Type de phénol/Flavonoïde possible (Markhan, 1982)		Couleur sous lampe UV 366 nm	Type de phénol/Flavonoïde possible (Markhan, 1982)
<i>Cistus libanotis</i> L	Violet	Flavones	<i>Cistus ladaniferus</i> L	Violet	Flavones
	Violet	Flavones		Violet	Flavones
	Sombre	/		Mauve	Anthocyanidine-3-glycoside
	Sombre	/		Bleu	Ac Phénol
	Bleu clair	Ac Phénol		Bleu	Ac Phénol
	Vert clair	Flavonols, Flavanones et Aurones		Bleu	Ac Phénol
	Rouge orangé	Anthocyanidine-3-glycoside		Bleu	Ac Phénol
			Gris sombre	Flavonos	
			Rouge	Anthocyanidine 3-glycoside.	

D'après le tableau ci-dessus, on peut noter que l'utilisation de l'eau dans le système d'éluion a une influence sur la séparation des composés polaire présents dans l'extrait végétal.

Dans la première espèce *Cistus ladaniferus* L. (éluion par CME (90/10/5)), 10 ont été de couleurs différentes : 2 violettes, mauve, 4 bleues, jaune, gris sombre et rouge qui correspondent aux :

flavones, ac phénol, flavonols et anthocyanidine-3-glycoside.

Pour notre espèce d'étude *Cistus libanotis* L. (élution par CM 10/2) on a observé 07 taches : 02 violettes, 02 sombre, bleue claire, verte et rouge orangé qui correspondent aux : flavones, ac phénol, flavonols, flavanones, aurones et anthocyanidine-3-glycoside.

A partir de la séparation, on peut conclure que les deux systèmes de solvants (CME et CM) ont permis l'apparition les mêmes taches et par conséquent les mêmes composés à l'exception d'une seule tache de couleur verte qui est apparue que dans l'extrait de *Cistus libanotis* L., qui correspond soit à un flavonol ou en flavanone ou encore aurone.

D'après les résultats de la CCM, les deux espèces ont presque la même composition chimique à savoir : flavones, ac phénol, flavonols, anthocyanidine-3-glycoside et anthocyanidine 3-5 diglycoside.

## VI Spectre UV-Visible des extraits méthanoliques

La spectrophotométrie est une méthode basée sur l'absorption des composés constituant l'extrait végétal (extrait méthanolique), contre un étalon (le méthanol) pour subir un balayage dans un spectrophotomètre UV-Visible de 209-663 nm (Figure 23).

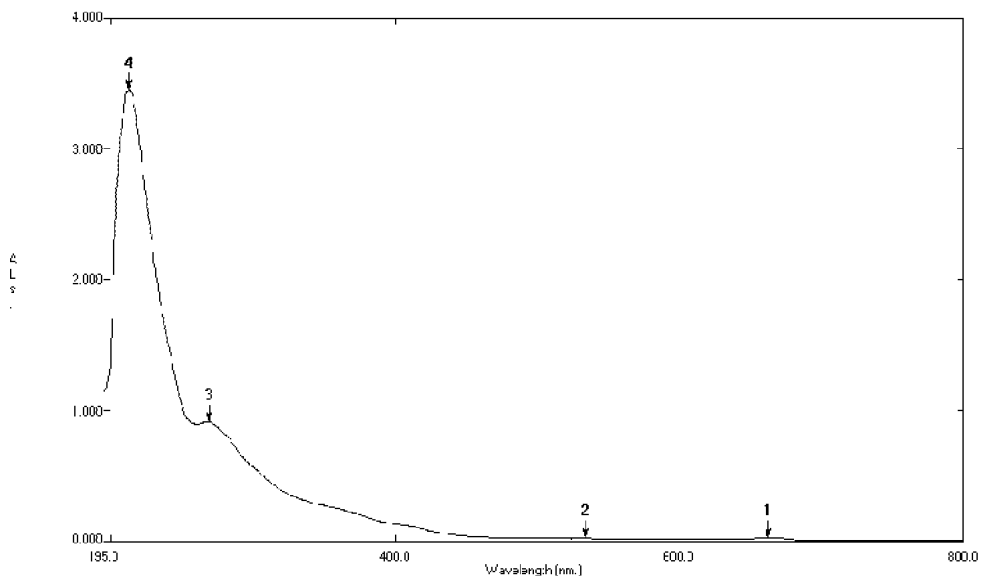
Pour choisir la longueur d'onde d'absorption maximale, il faut connaître les chromophores élémentaires (Tableau 25).

**Tableau 25:** Longueurs d'ondes maximales de quelques Chromophores élémentaires.

Chromophores élémentaires	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
> C = C < (alcène)	173*	10000
- C ≡ C - (alcyne)	178*	2000
> C = O (cétone)	290	16
- CH = O (aldéhyde)	279	15
- COOH (acide)	208	32
- COCl (chlorure d'acide)	220	100
- CONH2 (amide)	220	63
- COOR (ester)	211	57
- NO2 (nitro)	214	17
- N = N - (azométhane)	338	4
Chromophores conjugués		
>C=C-C=C< (linéaire)	220	30000
>C=C-C=O (dans un cycle)	244	10000

\* spectre dans le n-heptane

Les spectres d'absorption obtenus sont représentés dans la figure 23.



**Fig.23:** Spectre d'absorption de l'extrait méthanolique

D'après le graphe on a obtenu 4 pics dont leurs longueurs d'ondes sont résumés dans le tableau 26.

**Tableau 26:** Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible

Pics	Longueurs d'onde ( $\lambda$ ) nm	Absorbance
Pic 1	662,50	0,0212
Pic2	601	0,0138
Pic3	268,5	0,5988
Pic4	209,5	2,5741

L'analyse spectroscopique a montré 04 pics :

Le pic 1 : a une longueur d'onde 662,50 nm, cette dernière est semblable a celle de la chlorophylle a et b

Le pic 2 : a une longueur d'onde de 601 nm .

Le pic 3 : a une longueur d'onde de 268,5 nm, qui correspond aux acides gras insaturés de certaines huiles.

Le pic 4 : a une longueur d'onde de 209,5 nm, qui représente le benzène.

La longueur d'onde maximale est 209,5 nm qui correspond a l'absorbance maximale  $DO = 2,5741$ . Le tableau 25 représente les longueurs d'ondes maximales de quelques fonctions, la longueur d'onde maximale dans le graphe est de 209,5 nm proche a celle décrit dans le tableau 25 (208 nm) qui est spécifique a la fonction acide (COOH) .

On peut dire que l'extrait méthanolique de *Cistus libanotis* L. contient une quantité d'acide phénol.