Républiques Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR – KHENCHELA –
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DU BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Analyse phytochimique et screening des propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne des extraits d'écorce et de résine du Pin d'Alep originaire de Khenchela.

Réalisé par

- BENDJEDDOU Anouar
- HIMER Sami

Jury de soutenance

Président : Dr. ZERAIB Azzedine	M.C.A	Université Abbés Laghrour-Khenchela
Encadrante : Dr. DOUAOUYA Lilia	M.C.A	Université Abbés Laghrour-Khenchela
Examinatrice : Dr. SAIDI Malika	M.C.B	Université Abbés Laghrour-Khenchela

Année universitaire 2025/2026

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Allah, le Tout-Puissant, de nous avoir accordé la force, le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et notre sincère respect à notre directrice de mémoire, Madame le Docteur DOUAOUYA Lilia, pour son encadrement rigoureux, ses précieux conseils et son soutien indéfectible tout au long de cette formation. Nous adressons également nos sincères remerciements aux membres du jury, qui ont bien voulu consacrer leur temps et leur expertise à l'évaluation de ce mémoire.

Nos remerciements vont également à l'ensemble des enseignants du département qui, par leur dévouement et leur compétence, ont contribué à notre formation universitaire et à l'acquisition des connaissances qui ont rendu possible la réalisation de ce travail.

Nous exprimons notre plus vive reconnaissance à notre famille, et tout particulièrement à nos parents, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices, leur soutien constant et leur confiance indéfectible. Leur présence a été une source intarissable de motivation et d'énergie tout au long de notre parcours.

Une pensée chaleureuse est adressée à nos frères, sœurs et proches, pour leur présence bienveillante, leur soutien moral et leurs encouragements qui nous ont accompagnés tout au long de cette aventure universitaire.

Nous remercions chaleureusement nos amis et camarades de promotion avec lesquels nous avons partagé de précieux moments durant ces années d'études. Leur solidarité, leur amitié et leur bonne humeur resteront gravées dans notre mémoire.

Enfin, nous adressons nos remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire et à la réussite de notre parcours universitaire. Ce travail est l'aboutissement d'efforts soutenus, de persévérance et de détermination. Nous en sommes fiers, et il représente pour nous une étape fondatrice et inoubliable dans notre vie.

DÉDICACE

C'est avec une immense fierté et une profonde humilité que nous dédions ce modeste travail

À nos très chers parents, source inépuisable d'amour, de sacrifices et de bienveillance. Votre soutien indéfectible et vos encouragements constants ont été le socle de notre réussite. Aucun mot ne pourrait exprimer à sa juste valeur la profonde gratitude que nous vous devons.

À nos familles, qui ont toujours cru en nous et nous ont accompagnés avec amour dans les épreuves comme dans les joies, nous leur témoignons notre reconnaissance la plus sincère.

À nos frères et sœurs, pour leur affection sincère, leur soutien moral et leur présence précieuse qui ont illuminé notre quotidien tout au long de ce parcours.

À nos amis et camarades, avec lesquels nous avons partagé de précieux souvenirs et des moments inoubliables tout au long de nos années universitaires. Leur amitié restera gravée dans nos cœurs.

À tous nos enseignants, qui ont, par leur dévouement et leur passion du savoir, contribué à notre formation intellectuelle et à notre épanouissement personnel.

À toutes les personnes qui nous sont chères et qui, de près ou de loin, ont soutenu notre démarche et cru en notre potentiel.

Enfin, nous nous dédions ce travail à nous-mêmes, Anouar et Sami, en hommage à notre persévérance, notre rigueur et notre détermination sans faille. Malgré la fatigue, le doute et les défis qui ont jalonné ce parcours, nous avons su avancer avec courage, résilience et ambition, jusqu'à l'aboutissement de ce mémoire qui représente, à nos yeux, bien plus qu'un simple travail académique : une fierté et une victoire partagée.

ANOUAR & SAMI

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	
Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION……..	1
MATERIEL ET METHODES……	11
1. MATERIEL…….	11
1.1. Matériel biologique……..	11
1.1.1. Matériel végétal……...	11
1.1.2. Échantillons sanguins…….	12
1.1.3. Souches bactériennes……..	12
1.2. Médicament de référence……...	13
1.3. Réactifs et appareillage……..	13
2. METHODES…….	13
2.1. Extraction……...	13
2.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique…….	13
2.1.2. Extraction de l'huile essentielle……..	14
2.1.3. Détermination du rendement d'extraction…….	15
2.2. Etude phytochimique…….	15
2.2.1. Criblage phytochimique qualitatif…….	15
2.2.2. Dosage des flavonoïdes (méthode au chlorure d'aluminium)……	17

2.3. Évaluation des activités biologiques…….	
2.3.1. Activité antioxydante in vitro (test DPPH)……	18
2.3.2. Activité anti-inflammatoire (activité anti-hémolytique)……..	19
2.3.3. Activité antibactérienne……	21
1) Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)…….	21
2) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)…….	24
RESULTATS ET DISCUSSION……..	26
1. Etude phytochimique……..	26
1.1. Rendement d'extraction……	26
1.2. Criblage phytochimique……..	28
1.3. Analyse quantitative (Dosage des flavonoïdes)…….	31
2. Etude des activités biologiques…….	34
2.1. Évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante par la méthode DPPH…….	34
2.2. Évaluation de l'Activité anti-inflammatoire (anti-hémolytique)……	37
2.3. Activité antibactérienne……..	39
CONCLUSION ET PERSPECTIVES……..	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……	46
Annexes…….	51

Composition phytochimique et évaluation des activités antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne des extraits d'écorce et de résine de Pin d'Alep de Khenchela

Résumé

Face à l'urgence de découvrir de nouvelles molécules bioactives capables de contrer les pathologies chroniques et la résistance aux antimicrobiens, cette étude a investigué le potentiel pharmacologique de *Pinus halepensis* Mill., une espèce emblématique de la flore méditerranéenne. Les prélèvements d'écorce interne, d'écorce moyenne et de résine ont été réalisés en février 2026 dans la région d'El Khazoum (Bouhamama, Khenchela). Les extraits méthanoliques ont été obtenus par macération hydro-méthanique (7:3, v/v), tandis que l'huile essentielle de résine a été isolée par hydrodistillation à l'appareil de Clevenger. Un criblage phytochimique qualitatif a révélé la présence de tanins, de flavonoïdes, de terpènes/stéroïdes et d'anthocyanes, avec une absence notable de saponines, d'alcaloïdes et de coumarines. Le dosage spectrophotométrique au chlorure d'aluminium a montré une teneur en flavonoïdes totaux supérieure dans l'écorce moyenne (5,940 µg EQ/mg), suivie de l'écorce interne (4,400 µg EQ/mg) et de la résine (0,685 µg EQ/mg). L'évaluation de l'activité antioxydante par le test au radical DPPH a mis en évidence une puissance antiradicalaire remarquable, particulièrement pour l'écorce interne (CI_{50} = 0,85 mg/mL), supérieure à celle de l'acide ascorbique. L'activité anti-inflammatoire, appréciée par le test de protection anti-hémolytique sur érythrocytes humains, a démontré une stabilisation membranaire dose-dépendante significative (84,2 % à 1 mg/mL). Enfin, l'activité antibactérienne, testée par diffusion sur disque et microdilution en bouillon contre 7 souches de référence, a révélé une efficacité marquée de l'huile essentielle de résine, notamment contre les bactéries Gram positif, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de 7,5 à 30 µg/mL. Ces résultats confirment que l'écorce et la résine de *P. halepensis* constituent des matrices sous-exploitées, riches en métabolites secondaires et dotées d'un potentiel thérapeutique prometteur pour le développement de phytomédicaments.

Mots-clés : *Pinus halepensis* ; écorce ; résine ; activité antioxydante ; activité anti-inflammatoire ; activité antibactérienne.

Phytochemical analysis and screening of the antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial properties of bark and resin extracts from Aleppo pine of Khenchela

Abstract

Faced with the urgency of discovering new bioactive molecules capable of countering chronic pathologies and antimicrobial resistance, this study investigated the pharmacological potential of *Pinus halepensis* Mill., an emblematic species of Mediterranean flora. Samples of inner bark, middle bark, and resin were collected in February 2026 in the El Khazoum region (Bouhamama, Khenchela). Methanolic extracts were obtained by hydro-methanolic maceration (7:3, v/v), while the essential oil from resin was isolated by hydrodistillation using a Clevenger apparatus. Qualitative phytochemical screening revealed the presence of tannins, flavonoids, terpenes/steroids, and anthocyanins, with a notable absence of saponins, alkaloids, and coumarins. Spectrophotometric quantification using aluminum chloride showed a higher total flavonoid content in the middle bark (5.940 µg QE/mg), followed by the inner bark (4.400 µg QE/mg) and resin (0.685 µg QE/mg). Evaluation of antioxidant activity by the DPPH radical scavenging test highlighted remarkable antiradical power, particularly for the inner bark (IC_{50} = 0.85 mg/mL), superior to that of ascorbic acid. Anti-inflammatory activity, assessed by the anti-hemolytic protection test on human erythrocytes, demonstrated significant dose-dependent membrane stabilization (84.2% at 1 mg/mL). Finally, antibacterial activity, tested by disk diffusion and broth microdilution against 7 reference strains, revealed marked efficacy of the resin essential oil, particularly against Gram-positive bacteria, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 7.5 to 30 µg/mL. These results confirm that the bark and resin of *P. halepensis* constitute underexploited matrices, rich in secondary metabolites and endowed with promising therapeutic potential for the development of phytomedicines.

Keywords: *Pinus halepensis*; bark; resin; antioxidant activity; anti-inflammatory activity; antibacterial activity.

التركيب الكيميائي النباتي وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب والمضادة للبكتيريا من ولاية خنشلة، الجزائر (*Pinus halepensis* Mill.) لمستخلصات اللحاء والراتنج لصنوبر حلب.

الملخص

في ظلّ الحاجة الملحّة إلى تطوير بدائل علاجية جديدة لمواجهة الأمراض المزمنة ومقاومة المضادات الحيوية، تُقيّم هذه الدراسة التركيبةَ الفيتوكيميائية والأنشطةَ البيولوجية لنبات *Pinus halepensis Mill*.، نوعٌ حرجي بارز في حوض البحر المتوسط، جُمعت عيناته في ظروف شتوية (فبراير 2026) من النظام البيئي الجبلي شبه الجاف للخزوم (بوحمامة، خنشلة؛ 35°13′19″ شمالاً، 6°44′48″ شرقاً؛ ارتفاع 1163 م). أُعِدَّت مستخلصات ميثانولية خامة من اللحاء الداخلي واللحاء الأوسط بالتنقيع المائي-الميثانولي (ميثانول/ماء، 7:3، حجم/حجم) بمردودَين بلغا على التوالي 24 % و28 %، فيما عُزل الزيت العطري من الراتنج بالتقطير بالماء باستخدام جهاز كليفنجر بمردود لافت بلغ 6 %، يفوق بكثير القيم المُبلَّغ عنها للإبر في الأدبيات العلمية (0.32–0.91 %). كشف الفحص الفيتو كيميائي النوعي عن وجود العفصيات والفلافونويدات والتربينات/الستيرويدات والمركبات المختزلة في مستخلصات اللحاء، مع غياب ملحوظ للصابونينات والقلويات والكومارينات في الأقسام النباتية الثلاثة.
أظهر التقدير الطيفي بطريقة كلوريد الألومنيوم محتوىً كليًّا من الفلافونويدات أعلى في اللحاء الأوسط (5.940 ميكروغرام معادل الكيرسيتين/ملغ من المستخلص)، تلاه اللحاء الداخلي (4.400 ميكروغرام/ملغ)، ثم الراتنج (0.685 ميكروغرام/ملغ)، ما يعكس التخصص الأيضي لكل قسم. أبرز تقييم النشاط المضاد للأكسدة باختبار اصطياد جذر DPPH فاعليةً تعتمد على الجرعة لجميع المستخلصات، إذ سجّل اللحاء الداخلي (IC_{50} = 0.85 ملغ/مل) أدنى تركيز مثبط وسطي — أقل من حامض الأسكوربيك المرجع — بينما أظهر اللحاء الأوسط (IC50 = 2.21 ملغ/مل) والراتنج (IC50 = 3.28 ملغ/مل) نشاطاً أدنى لكنه معتبر. يُشير الفصل بين محتوى الفلافونويدات والفاعلية المضادة للجذور إلى دور محوري للعفصيات المكثّفة في النشاط المضاد للأكسدة في اللحاء الداخلي.
أبدى النشاط المضاد للالتهابات، المُقيَّم باختبار الحماية المضادة للتحلل الدموي على كريات الدم الحمراء البشرية تجاه الإجهاد التنافذي بمحلول كلوريد الصوديوم (2 %)، استقراراً غشائياً يعتمد على الجرعة وصل إلى 84.2 % عند 1 ملغ/مل.

أما النشاط المضاد للبكتيريا، المُختبَر بالانتشار على القرص والتخفيف الدقيق في المرق ضد 7 سلالات مرجعية كشف عن فاعلية انتقائية بارزة للزيت العطري من الراتنج، إذ أوقف نمو جميع السلالات بما فيها *Pseudomonas aeruginosa* و*Escherichia coli*.

تراوحت تراكيز التثبيط الدنيا (CMI) بين 7.5 ميكروغرام/مل ضد *Bacillus cereus* و30 ميكروغرام/مل ضد *Salmonella enterica*. تؤكد هذه النتائج أن لحاء وراتنج *P. halepensis* من منطقة خنشلة يُشكّلان مصفوفتين طبيعيتين مستغلَّتين بشكل غير كافٍ، غنيّتين بأيضيات ثانوية متكاملة، وتتمتعان بإمكانات علاجية واعدة لتطوير الأدوية النباتية المضادة للأكسدة والالتهابات والبكتيريا
.

الكلمات المفتاحية: *Pinus halepensis*؛ اللحاء؛ الراتنج؛ البوليفينولات؛ الفلافونويدات؛ النشاط المضاد للأكسدة؛ النشاط المضاد للالتهابات؛ النشاط المضاد للبكتيريا؛ الزيت العطري.

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
$AlCl_3$	Chlorure d'aluminium
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butylhydroxytoluène (hydroxytoluène butylé)
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CI_{50} / IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane (50 %)
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COX-2	Cyclooxygénase-2
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle
EC_{50}	Concentration efficace à 50 %
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EM	Extrait méthanolique
EAG	Équivalent acide gallique
EQ	Équivalent quercétine
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
$FeCl_3$	Chlorure de fer(III)
FRAP	Pouvoir réducteur du fer (Ferric Reducing Antioxidant Power)
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HE	Huile essentielle
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPLC-MS	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
HRBC	Human Red Blood Cells (globules rouges humains)
H_2SO_4	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
$HgCl_2$	Chlorure mercurique
iNOS	Synthase de l'oxyde nitrique inductible
KI	Iodure de potassium
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MAE	Extraction assistée par micro-ondes (Microwave-Assisted Extraction)
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NCIMB	National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria
NCTC	National Collection of Type Cultures
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NH_4OH	Hydroxyde d'ammonium
NO	Monoxyde d'azote
PBS	Tampon phosphate salin
RE	Équivalent rutine

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Page
1	Coupe anatomique du tronc d'un Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) : écorce, phloème et gemmage	16
2	Carte géographique : région d'El Khazoum, Bouhamama, Khenchela, Algérie	17
3	Rotavapor utilisé pour la concentration des extraits végétaux	19
4	Procédé d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation (Clevenger)	20
5	Chélation de la quercétine par les ions aluminium	23
6	Forme libre et réduite du DPPH	23
7	Préparation de l'inoculum bactérien	27
8	Ensemencement des boîtes de Pétri	28
9	Préparation des disques d'aromatogrammes en présence des extraits	28
10	Mesure du diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse	29
11	Protocole de microdilution en microplaque pour la détermination de la CMI des extraits et de l'huile essentielle	30
12	Courbe d'étalonnage de la quercétine	37
13	Teneur en flavonoïdes des extraits du Pin d'Alep	38
14	Activité antiradicalaire des extraits du pin d'Alep	40
15	IC_{50} des extraits du pin d'Alep inhibant le DPPH	40
16	Activité anti-inflammatoire (anti-hémolytique) des extraits du pin d'Alep	42

Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
1	Souches bactériennes de référence utilisées	17
2	Critères d'interprétation des zones d'inhibition (Celikel & Kavas, 2008)	29
3	Rendement de l'extraction	31
4	Analyse phytochimique préliminaire des extraits de *Pinus halepensis*	33
5	Activité antibactérienne des extraits de *Pinus halepensis* selon la méthode des Disques	45
6	Résultats de CMI des extraits du pin d'Alep vis-à-vis les souches bactériennes de référence	47

INTRODUCTION

1. Plantes médicinales et quête de nouvelles molécules bioactives

L'histoire de la médecine est indissociable de celle des plantes. Dès l'Antiquité, les sociétés humaines ont puisé dans le règne végétal pour soigner leurs maux et préserver leur santé. Cette tradition perdure : l'Organisation Mondiale de la Santé estime encore aujourd'hui que près de 80 % de la population mondiale, particulièrement dans les pays en développement, fait appel aux médecines traditionnelles à base de plantes pour ses besoins thérapeutiques primaires (Newman & Cragg, 2020). Ces dernières décennies, cette tendance s'est accentuée sous la double pression d'une demande croissante en thérapies naturelles et de l'urgence à découvrir de nouvelles molécules capables de contrer des pathologies multifactorielles — maladies cardiovasculaires, cancers, maladies neurodégénératives, infections nosocomiales. La biodiversité végétale, notamment celle des régions méditerranéennes où l'endémisme et l'adaptation à des conditions climatiques extrêmes ont façonné des espèces uniques, constitue un réservoir inestimable de métabolites secondaires aux propriétés pharmacologiques potentielles (Atanasov *et al.*, 2021).

Les métabolites secondaires — flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, terpènoïdes, saponines et glycosides — forment la base chimique de l'activité biologique des plantes médicinales. Si ces composés ne participent pas directement aux processus vitaux primaires, ils jouent un rôle déterminant dans les interactions de la plante avec son environnement, notamment en assurant sa défense contre les herbivores, les agents pathogènes et le stress oxydatif (González-Burgos & Gómez-Serranillos, 2022). Chez l'homme, de nombreuses études ont démontré leur palette d'effets bénéfiques : piégeage des radicaux libres, modulation de la réponse inflammatoire, inhibition de la croissance microbienne, protection des membranes cellulaires contre les agressions oxydatives (Benzie & Wachtel-Galor, 2023). La recherche de ces molécules naturelles est ainsi devenue un enjeu central de la pharmacognosie moderne, d'autant plus que les thérapeutiques conventionnelles peinent face à la résistance aux antimicrobiens et aux effets indésirables des médicaments de synthèse.

2. Le genre *Pinus* : une source traditionnelle de remèdes naturels

Parmi les familles végétales les plus prometteuses sur le plan pharmacologique, les Pinaceae occupent une place de choix. Ce genre de conifères, largement distribué dans l'hémisphère nord, regroupe plus de 100 espèces dont plusieurs sont exploitées depuis l'Antiquité pour leurs vertus curatives. Aiguilles, écorce, cônes, résine et graines ont tous servi, sous une forme ou une autre,

à traiter les affections respiratoires, les troubles rhumatismaux, les plaies, les brûlures et les infections cutanées (Macchioni *et al.*, 2003). Dans le bassin méditerranéen en particulier, les populations autochtones ont développé une connaissance empirique approfondie des pins : bourgeons utilisés en infusions expectorantes, résine appliquée comme cicatrisant et antiseptique local, écorce reconnue pour ses propriétés astringentes et anti-inflammatoires.

L'intérêt scientifique pour le genre *Pinus* ne cesse de croître, porté par l'identification de composés bioactifs d'une grande diversité structurale. Les analyses phytochimiques récentes ont révélé la présence abondante de polyphénols, flavonoïdes, acides phénoliques, proanthocyanidines, stilbènes et terpènes dans les extraits de ces espèces (Kang *et al.*, 2010). Ces métabolites confèrent aux extraits de pin une activité antioxydante significative, liée à leur capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à inhiber la peroxydation lipidique. Plusieurs études ont également mis en évidence des effets anti-inflammatoires notables, médiés par la modulation de l'expression de l'iNOS et de la COX-2, ainsi que des propriétés antimicrobiennes et antifongiques prometteuses (Yen *et al.*, 2008). Ces données confortent l'idée que les ressources forestières méditerranéennes, et notamment les espèces du genre *Pinus*, méritent une investigation approfondie dans le cadre de la recherche pharmaceutique moderne.

3. *Pinus halepensis* Mill. (Pin d'Alep) : distribution, écologie et importance socio-économique

Pinus halepensis Mill., communément appelé Pin d'Alep, est une espèce emblématique de la flore méditerranéenne. Originaire du bassin méditerranéen oriental, elle s'étend sur un vaste territoire allant de l'Espagne et du Maroc à l'ouest jusqu'à la Syrie et la Turquie à l'est, en passant par l'Algérie, la Tunisie, la Libye, la Grèce et l'Italie (Quezel & Médail, 2003). Espèce pionnière, elle colonise préférentiellement les zones semi-arides et les écosystèmes forestiers de montagne où elle joue un rôle écologique fondamental : fixation des sols, lutte contre l'érosion, préservation de la biodiversité. En Algérie, le Pin d'Alep constitue l'essence forestière la plus répandue, couvrant plus de 800 000 hectares, notamment dans les régions telliennes et les massifs montagneux du Nord-Est, y compris la wilaya de Khenchela (Djellouli *et al.*, 2020). Son importance socio-économique dépasse largement le cadre de la sylviculture. Son bois alimente l'industrie du meuble et de la construction ; sa résine sert à la production de colophane et de térébenthine ; ses graines sont consommées localement sous forme de pignons ou utilisées dans la préparation de desserts traditionnels (Cheikh-Rouhou *et al.*, 2006). Mais c'est dans le domaine de la médecine traditionnelle que cette espèce revêt un intérêt particulier. Les populations rurales algériennes, notamment dans les régions de l'Aurès et des Hauts Plateaux,

utilisent depuis des générations différentes parties de l'arbre pour soigner un large éventail de pathologies. L'écorce entre en décoction pour ses propriétés astringentes et antipyrétiques ; la résine est appliquée topiquement sur les plaies et les brûlures pour accélérer la cicatrisation et prévenir les infections ; les aiguilles sont infusées pour soulager les troubles respiratoires et rhumatismaux (Fekih *et al.*, 2014). Ces usages, transmis de génération en génération, constituent une base ethnopharmacologique solide qui justifie une investigation scientifique rigoureuse des propriétés bioactives de cette espèce.

4. Usages ethnopharmacologiques et potentiel thérapeutique du Pin d'Alep

L'ethnopharmacologie du Pin d'Alep est particulièrement riche et diversifiée à travers le pourtour méditerranéen. Dans les pays arabes, les graines de *P. halepensis* entrent dans la composition de préparations culinaires et médicinales, notamment pour leurs vertus nutritives et énergétiques (Kadri *et al.*, 2014). En médecine populaire nord-africaine, l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des aiguilles et des branches est réputée pour ses propriétés antiseptiques, antituberculeuses et antirhumatismales. La résine, quant à elle, constitue une matière première précieuse pour la préparation de pommades cicatrisantes et de baumes expectorants (Macchioni *et al.*, 2003). Les extraits aqueux et alcooliques de l'écorce sont également utilisés dans le traitement des diarrhées, dysenteries et infections gastro-intestinales, en raison de leur teneur élevée en tanins condensés et en composés phénoliques.

Ces usages traditionnels trouvent un écho croissant dans la littérature scientifique internationale. Plusieurs études ont démontré que les extraits de *P. halepensis* possèdent une activité anticoagulante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antibactérienne, antifongique, larvicide, antioxydante et même antiproliférative vis-à-vis de certaines lignées cellulaires cancéreuses (Basholli-Salihu *et al.*, 2017 ; Mitić *et al.*, 2019). La résine et les extraits d'écorce ont montré une efficacité notable dans la protection des tissus contre les lésions oxydatives et dans la modulation de la réponse immunitaire innée (Kotroni *et al.*, 2019). De plus, les fractions lipidiques des graines ont fait l'objet d'études précliniques démontrant un potentiel antiangiogénique, ouvrant ainsi des perspectives intéressantes en cancérologie (Kadri *et al.*, 2014). L'ensemble de ces données suggère que *Pinus halepensis* Mill. constitue une source naturelle polyvalente de principes actifs, dont l'exploitation rationnelle pourrait conduire au développement de nouveaux phytomédicaments.

5. Composition phytochimique : métabolites secondaires du Pin d'Alep

La richesse pharmacologique de *Pinus halepensis* repose sur une composition phytochimique complexe et variée, qui diffère selon la partie de la plante considérée, la méthode d'extraction, le stade phénologique et les conditions écologiques du site de prélèvement. Les études les plus

récentes ont permis d'identifier plusieurs familles de métabolites secondaires d'intérêt : terpènes, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, saponines, coumarines et glycosides cardiaques (Bouyahya *et al.*, 2019 ; Aloui *et al.*, 2021).

L'huile essentielle du Pin d'Alep, généralement extraite par hydrodistillation des aiguilles, des branches ou de la résine, se caractérise par une prédominance de monoterpènes et de sesquiterpènes. Les composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles d'origine algérienne et tunisienne sont le β-caryophyllène, l'α-pinène, le cembrene, le cyclofenchene, le camphene et le caryophyllène oxyde (Fekih *et al.*, 2014 ; Mitić *et al.*, 2019). Une étude comparative récente a montré que la méthode d'extraction influence significativement le profil chimique : l'hydrodistillation classique favorise l'extraction du cembrene et du cyclofenchene, tandis que l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) permet d'obtenir des teneurs plus élevées en β-caryophyllène et en α-caryophyllène (ACS Omega, 2026). Ces terpènoïdes volatils sont largement responsables des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes de l'huile essentielle.

Parallèlement, les extraits polaires, notamment les extraits méthanoliques de l'écorce et de la résine, se distinguent par leur richesse en composés phénoliques. Les analyses par HPLC-MS ont permis d'identifier plusieurs acides phénoliques, dont l'acide protocatéchique et l'acide *p*-coumaroylquinique, ainsi que des flavonolglycosides tels que la quercétine-3-O-glucoside, le myricétine-3-O-glucoside et la narcissine (Processes, 2026). La quercétine, en particulier, est reconnue pour sa capacité à chéler les ions métalliques et à former des complexes stables avec les ions aluminium, générant une coloration jaune mesurable à 430 nm, ce qui constitue la base de son dosage spectrophotométrique (Khaldi *et al.*, 2025). Les tanins hydrolysables et condensés confèrent aux extraits une activité astringente et une capacité de précipitation des protéines, propriétés exploitées dans les tests de criblage phytochimique qualitatif.

6. Flavonoïdes et polyphénols : acteurs clés de l'activité biologique

Les flavonoïdes et les polyphénols constituent sans doute la classe de métabolites secondaires la plus étudiée chez *Pinus halepensis*, en raison de leurs multiples implications dans la protection biologique. Leur structure chimique, caractérisée par la présence de noyaux aromatiques hydroxylés, leur confère une capacité exceptionnelle à donner des électrons ou des atomes d'hydrogène aux radicaux libres, stabilisant ainsi les espèces oxydantes réactives (González-Burgos & Gómez-Serranillos, 2022). Les travaux de Meziti *et al*. (2019) ont démontré que les extraits méthanoliques de *P. halepensis* et de *Quercus ilex* présentent à la fois une activité antioxydante significative, une protection anti-hémolytique des érythrocytes

humains et un effet géno-protecteur, attribuables principalement à leur teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes totaux.

Le contenu en polyphénols des aiguilles de *P. halepensis* a été quantifié à des valeurs allant jusqu'à 524,46 mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche, tandis que la teneur en flavonoïdes atteint 111,64 mg d'équivalent quercétine par gramme de matière sèche (Processes, 2026). Ces valeurs, parmi les plus élevées rapportées pour le genre *Pinus*, expliquent la puissance antiradicalaire des extraits, avec des valeurs de CI_{50} particulièrement faibles dans les tests de piégeage du radical DPPH. Le mécanisme d'action repose sur le transfert d'un atome d'hydrogène du donneur antioxydant (AH) au radical DPPH•, conduisant à la formation de la DPPH-H de couleur jaune pâle et à la disparition de la coloration violette caractéristique (Molyneux, 2004). Cette réaction, quantifiable par spectrophotométrie à 517 nm, constitue un outil standard pour l'évaluation comparative de l'efficacité antioxydante des extraits végétaux.

7. Activité antioxydante : enjeux physiologiques et méthodologiques

Le stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre la production d'espèces oxygénées réactives et la capacité des systèmes de défense antioxydante endogènes, est impliqué dans l'initiation et la progression de nombreuses pathologies chroniques — maladies cardiovasculaires, diabète, cancers, maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Uchida, 2003). Les antioxydants d'origine naturelle, par opposition aux molécules de synthèse, présentent l'avantage d'être mieux tolérés par l'organisme et d'exercer des effets multiples grâce à leur complexité structurale. Dans ce contexte, les extraits de *Pinus halepensis* apparaissent comme des candidats privilégiés pour le développement de nouvelles stratégies nutritionnelles et thérapeutiques visant à prévenir ou à atténuer les dommages induits par le stress oxydatif.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits végétaux fait appel à une batterie de tests *in vitro* complémentaires. Le test au radical DPPH, largement utilisé pour sa simplicité et sa reproductibilité, mesure la capacité d'un extrait à piéger les radicaux libres stables par transfert d'hydrogène. Les résultats sont généralement exprimés en pourcentage d'inhibition ou en concentration inhibitrice médiane (CI_{50}), c'est-à-dire la concentration nécessaire pour réduire de 50 % l'absorbance initiale de la solution de DPPH (Molyneux, 2004). Les études menées sur les extraits de *P. halepensis* ont systématiquement révélé des valeurs de CI_{50} faibles, témoignant d'une puissance antiradicalaire comparable, voire supérieure, à celle de standards antioxydants comme l'acide ascorbique ou le BHT (Bouyahya *et al.*, 2019 ; Aloui *et al.*, 2021). Cette activité est corrélée positivement avec la teneur en flavonoïdes et en tanins, suggérant que ces familles de composés sont les principaux responsables de l'effet antioxydant

observé.

8. Propriétés anti-inflammatoires et protection membranaire

L'inflammation est une réponse physiologique fondamentale aux agressions tissulaires, qu'elles soient d'origine infectieuse, traumatique ou chimique. Mais lorsqu'elle devient chronique ou excessive, elle participe à la genèse de nombreuses pathologies, des maladies auto-immunes à l'athérosclérose, en passant par certaines formes de cancer. La recherche de molécules naturelles capables de moduler la réponse inflammatoire sans provoquer les effets secondaires des AINS ou des corticoïdes représente donc un défi majeur de la pharmacologie moderne (Basholli-Salihu *et al.,* 2017).

Les extraits de *Pinus halepensis* ont fait l'objet d'études approfondies concernant leur potentiel anti-inflammatoire. Une étude *in vivo* menée par Kotroni *et al.* (2019) a démontré que des patchs électrofilés chargés d'extraits d'écorce de Pin d'Alep, appliqués sur la peau de souris nues, réduisaient significativement l'inflammation induite, confirmant ainsi l'efficacité topique de ces préparations. Au niveau cellulaire, les huiles essentielles de *P. halepensis* ont montré une capacité à inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les prostaglandines et les cytokines, en modulant l'expression de la COX-2 et de l'iNOS (Yen *et al.,* 2008). Par ailleurs, l'activité anti-hémolytique des extraits méthanoliques de *P. halepensis* offre un modèle biologique pertinent pour évaluer la protection membranaire. Ce test, basé sur la capacité des extraits à préserver l'intégrité des érythrocytes humains soumis à un stress oxydatif induit par une solution saline hypotonique (NaCl 2 %), permet de quantifier l'effet protecteur des composés bioactifs sur les membranes lipidiques (Meziti *et al.,* 2019). La diminution de l'hémolyse, mesurée par la réduction de l'absorbance de l'hémoglobine libérée à 540 nm, traduit directement la capacité des extraits à stabiliser la bicouche lipidique et à inhiber la peroxydation des phospholipides membranaires.

9. Potentiel antibactérien et enjeux de la résistance aux antimicrobiens

L'émergence et la propagation des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques constituent aujourd'hui l'une des menaces les plus graves pour la santé publique mondiale. L'OMS a classé la résistance aux antimicrobiens parmi les dix principales menaces sanitaires, soulignant l'urgence de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (WHO, 2021). Dans cette perspective, les huiles essentielles et les extraits végétaux riches en composés aromatiques et phénoliques représentent une alternative prometteuse. Ils agissent souvent par des mécanismes multiples — altération de la membrane cytoplasmique, inhibition de la synthèse d'ATP, perturbation du métabolisme énergétique, inhibition de la formation du biofilm — rendant plus difficile l'apparition de phénomènes de résistance (Bouyahya *et al.,* 2019).

Pinus halepensis a démontré un potentiel antibactérien significatif contre un large spectre d'agents pathogènes, tant Gram-positives que Gram-négatives. Fekih *et al.* (2014) ont rapporté que l'huile essentielle de *P. halepensis* prélevée dans le nord-ouest de l'Algérie présentait une activité inhibitrice notable contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella* spp. Ces résultats ont été corroborés par Mitić *et al.* (2019), qui ont montré que les huiles essentielles de *P. halepensis* et *P. heldreichii* possédaient une activité antimicrobienne et une activité larvicide intéressantes, liées à leur richesse en β-caryophyllène et en α-pinène. La méthode de diffusion sur disque (aromatogramme), standardisée par le CLSI, permet de quantifier cette activité en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques imprégnés d'extrait. Les critères d'interprétation établis par Celikel & Kavas (2008) classent les souches comme résistantes (diamètre < 8 mm), sensibles (9–14 mm), très sensibles (15–19 mm) ou extrêmement sensibles (≥ 20 mm), offrant ainsi une échelle de référence pour la comparaison inter-études.

10. Variabilité géographique et influence des facteurs écologiques

La composition chimique et, par conséquent, l'activité biologique des extraits de *Pinus halepensis* sont sujettes à une grande variabilité intraspécifique, influencée par de multiples facteurs abiotiques et biotiques. Conditions climatiques, altitude, type de sol, exposition, âge de l'arbre et saison de récolte modulent significativement le métabolisme secondaire de la plante. Ainsi, les populations de Pin d'Alep croissant dans les écosystèmes semi-arides de montagne, comme la région d'El Khazoum dans la wilaya de Khenchela (35°19′13″ N, 6°44′48″ E, altitude 1 163 m), sont soumises à des stress environnementaux particuliers — sécheresse, UV intenses, fluctuations thermiques — susceptibles d'induire une synthèse accrue de composés de défense, notamment de flavonoïdes et de terpènes (Djellouli *et al.*, 2020).

Cette variabilité géographique a été clairement mise en évidence par les études comparatives menées sur les huiles essentielles de *P. halepensis* provenant de différents pays méditerranéens. Les échantillons tunisiens se caractérisent par une prédominance du β-caryophyllène et du cembrene, tandis que les échantillons algériens présentent des profils enrichis en α-pinène et en β-caryophyllène (Fekih *et al.*, 2014 ; ACS Omega, 2026). Les échantillons marocains, grecs et français montrent également des variations quantitatives notables, bien que les composés majoritaires restent globalement conservés au sein de l'espèce (Macchioni *et al.*, 2003 ; Mitić *et al.*, 2019). Ces différences régionales justifient pleinement la réalisation d'études locales approfondies, car les propriétés d'un extrait ne peuvent être extrapolées d'une provenance à une autre sans validation expérimentale. L'étude des populations algériennes de *P. halepensis*, et

plus particulièrement celles du Nord-Est du pays, demeure donc d'un intérêt majeur pour la valorisation de la biodiversité forestière nationale.

11. Intérêt des différentes parties de la plante : écorce et résine

Si la majorité des travaux scientifiques sur *Pinus halepensis* ont porté sur les aiguilles et les cônes, l'écorce et la résine demeurent des matrices végétales sous-exploitées malgré leur importance dans la médecine traditionnelle. L'écorce interne et l'écorce moyenne constituent des tissus riches en polyphénols, tanins et lignanes, accumulés dans le cadre des mécanismes de défense de l'arbre contre les agents pathogènes et les blessures mécaniques. Ces composés possèdent une forte affinité pour les protéines et les membranes biologiques, leur conférant des propriétés astringentes, antimicrobiennes et antioxydantes (Badawy *et al.*, 2017). L'extraction méthanolique de l'écorce, suivie d'une évaporation sous pression réduite, permet de concentrer ces métabolites polaires dans des extraits bruts présentant une activité biologique significative. La résine, sécrétion végétale complexe produite par les canaux résinifères en réponse aux blessures, est quant à elle constituée d'un mélange de terpènes volatils (essence ou huile essentielle) et de composés non volatils (diterpénoïdes acides, résines). L'extraction de l'huile essentielle de résine par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger permet d'isoler la fraction volatile, riche en monoterpènes et sesquiterpènes aux propriétés pharmacologiques documentées (M'hamdi, 2024). Cette fraction volatile, séparée de la fraction aqueuse par simple différence de densité, peut être conservée à 4 °C dans des flacons en verre fumé pour préserver sa stabilité chimique. L'étude comparative des extraits méthanoliques d'écorce et de l'huile essentielle de résine offre ainsi une vision globale du potentiel bioactif de *P. halepensis*, en couvrant à la fois les fractions polaires (phénols, flavonoïdes) et les fractions apolaires (terpènes).

12. Justification de l'étude et lacunes scientifiques

Malgré l'abondance de données ethnopharmacologiques et les avancées récentes dans la caractérisation phytochimique de *Pinus halepensis*, plusieurs lacunes demeurent dans la littérature, justifiant la présente investigation. Premièrement, la plupart des études antérieures se sont concentrées sur les aiguilles, les cônes ou les graines de l'arbre, laissant dans l'ombre l'écorce interne et la résine, pourtant largement utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne. Deuxièmement, rares sont les travaux ayant évalué simultanément les activités antioxydante, anti-inflammatoire (via le test anti-hémolytique) et antibactérienne sur des extraits provenant de la même provenance géographique et traités selon des protocoles standardisés. Troisièmement, la région de Khenchela, située dans les montagnes de l'Aurès et

caractérisée par un climat semi-aride de montagne, n'a fait l'objet d'aucune étude approfondie sur la composition chimique et les propriétés biologiques de sa flore forestière endémique, bien que cette zone abrite des populations naturelles de Pin d'Alep soumises à des stress environnementaux susceptibles d'induire une production optimale de métabolites secondaires. Enfin, la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de microdilution en bouillon, bien que recommandée par les instances de référence (CLSI, EUCAST), a été rarement appliquée aux extraits de *P. halepensis* d'origine algérienne, limitant ainsi la comparabilité des résultats avec ceux de la littérature internationale. La présente étude se propose donc de combler ces lacunes en adoptant une démarche intégrée allant du criblage phytochimique qualitatif et quantitatif à l'évaluation biologique *in vitro* sur des modèles pertinents de stress oxydatif, d'inflammation membranaire et d'infection bactérienne.

13. Objectifs de l'étude

À la lumière de ces constats, le présent travail de recherche s'articule autour d'un objectif principal et de plusieurs objectifs spécifiques. L'objectif principal est d'examiner la composition chimique et d'évaluer les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes de différentes fractions de *Pinus halepensis* Mill. (écorce interne, écorce moyenne et résine) prélevées dans la région d'El Khazoum (Bouhamama, Khenchela, Algérie).

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

1. **Préparer et caractériser** les extraits méthanoliques de l'écorce interne et de l'écorce moyenne, ainsi que l'huile essentielle de la résine, en déterminant leurs rendements d'extraction respectifs.
2. **Réaliser un criblage phytochimique qualitatif** des extraits méthanoliques bruts afin d'identifier les principales familles de métabolites secondaires présentes (tanins, alcaloïdes, saponines, anthocyanes, terpènes, stéroïdes, coumarines, cardénolides).
3. **Quantifier la teneur en flavonoïdes totaux** des extraits méthanoliques par la méthode spectrophotométrique au chlorure d'aluminium, en utilisant la quercétine comme standard de référence.
4. **Évaluer l'activité antioxydante** des extraits par le test de piégeage du radical DPPH, en déterminant les pourcentages d'inhibition et les valeurs de CI_{50}, avec l'acide ascorbique comme contrôle positif.
5. **Évaluer l'activité anti-inflammatoire** par le test de protection anti-hémolytique sur des érythrocytes humains, en utilisant le médicament de référence « Dicynone » (250 mg) comme témoin positif.

6. **Évaluer l'activité antibactérienne** de l'huile essentielle de résine et des extraits méthanoliques d'écorce contre un panel de neuf souches de référence (Gram positif et Gram négatif) par la méthode de diffusion sur disque et la méthode de microdilution en bouillon pour la détermination des CMI.

MATERIEL ET METHODES

L'objectif principal de cette étude est d'examiner la composition chimique et d'évaluer les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes de la plante médicinale Pin d'Alep (*Pinus halepensis Mill)*. Les expériences ont été menées dans le laboratoire de biochimie de l'Université Abbes Laghrour et dans le laboratoire central de l'hôpital Ahmed Ben Bella de Khenchela.

1. MATÉRIEL

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

Les prélèvements d'écorce interne, d'écorce moyenne et de résine de *Pinus halepensis* Mill. (Fig. 1) ont été réalisés en février 2026, dans la région d'El Khazoum (Bouhamama, Khenchela). La zone d'étude est limitée par les coordonnées géographiques 35° 19′ 13″ N, 6° 44′ 48″ E et une altitude moyenne de 1 163 mètres (Fig. 2), correspondant à un écosystème forestier semi-aride de montagne.

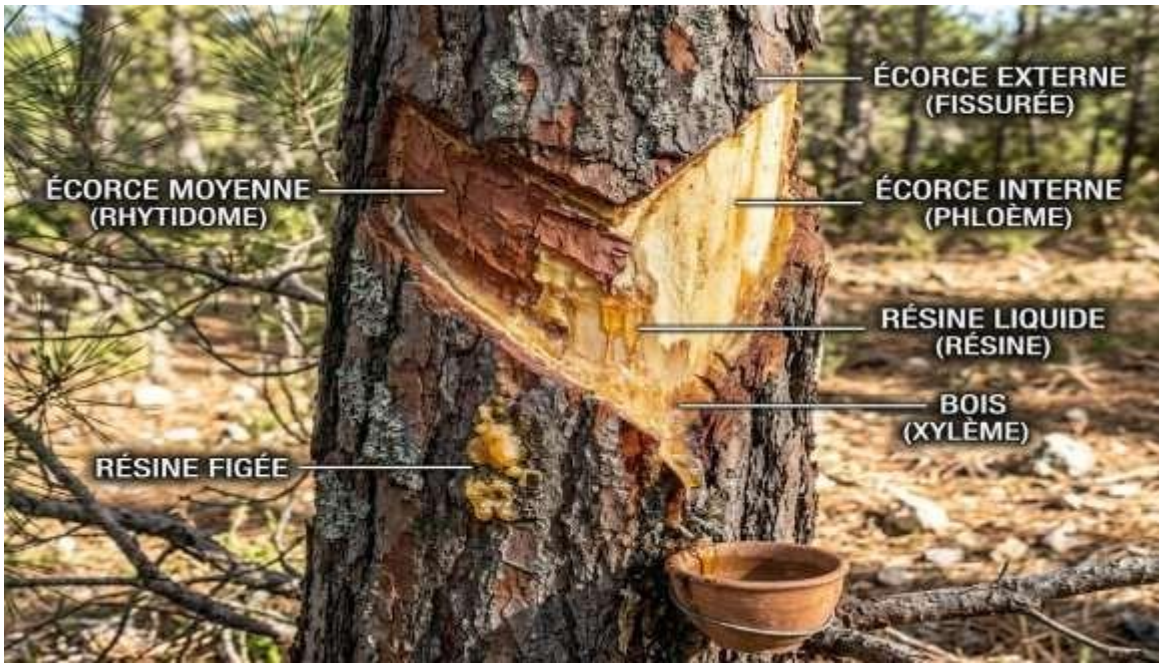


Fig. 1. Coupe anatomique du tronc d'un Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) : Écorce, phloème et gemmage

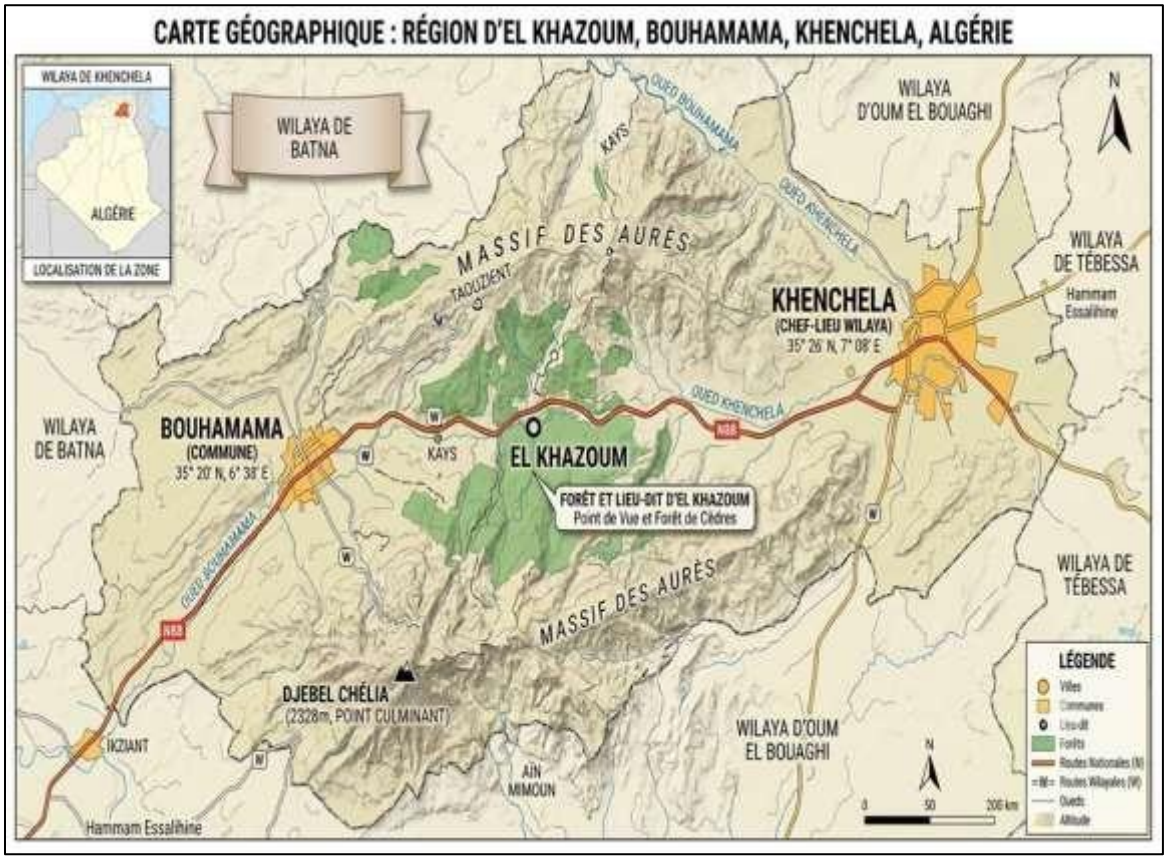


Fig. 2. Carte géographique : région d'El Khazoum, Bouhamama, Khenchela, Algérie

1.1.2. Échantillons sanguins

Les échantillons de sang ont été prélevés chez des volontaires sains non-fumeurs pour l'évaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits..

1.1.3. Souches bactériennes

Afin de tester le potentiel antibactérien in vitro des extraits de Pin d'Alep, 7 souches de référence provenant du laboratoire pédagogique de l'université Abbès Laghrour et du Centre national de biotechnologie (CRBt) de Constantine ont été utilisées (Tab. 1).

Tab. 1. Souches bactériennes de référence utilisées

Souche bactérienne	Coloration de Gram
Staphylococcus aureus (ATCC 6538)	Gram positif
Bacillus cereus (ATCC 10876)	Gram positif
Salmonella enterica (ATCC 13076)	Gram négatif
Salmonella enterica (ATCC 13076)	Gram négatif
Escherichia coli (NCTC 10538)	Gram négatif

Souche bactérienne	Coloration de Gram
Pseudomonas aeruginosa (NCIMB 8626)	Gram négatif
Klebsiella pneumoniae (ATCC 43816)	Gram négatif

1.2. Médicament de référence

Le médicament anti-hémolytique «diclofénac» à la concentration de 250 mg a été utilisé comme médicament de référence et témoin positif lors des tests d'activité anti-hémolytique.

1.3. Réactifs et appareillage

Les réactifs, solvants et produits chimiques utilisés au cours de cette étude ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) : chlorure de fer(III) ($FeCl_3$), hydroxyde de sodium (NaOH), chlorure de sodium (NaCl), chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), carbonate de sodium, acide sulfurique, acide chlorhydrique, acide acétique, acide ascorbique, acide gallique, réactif de Folin-Ciocalteu, réactif de Mayer, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), Tween 80, ainsi que les solvants chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol, méthanol, n-butanol et hexane. Le milieu de culture Mueller-Hinton a également été utilisé.

L'appareillage utilisé comprenait un évaporateur rotatif (Rotavapor®, HAHNVAPOR), un spectrophotomètre UV-visible (Spectrum SP-UV 2005), une chambre d'observation UV (254/365 nm, Vilber Lourmat), un bain-marie (Nüve Bath, Memmert), une étuve universelle (5–220 °C, Memmert), un appareil de Clevenger, un agitateur magnétique (Scilogex), un agitateur vortex (Velp), une balance analytique (Ohaus), une balance de précision (Kern PCB), une centrifugeuse (EZ Swing 3K, Rotofix 32A), un réfrigérateur (Liebherr), une plaque chauffante (LabTech), un autoclave (Raypa) et un pH-mètre (Hanna Instruments).

2. MÉTHODES

2.1. Extraction

2.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Après nettoyage, les échantillons frais ont été séchés à l'ombre, à l'abri du soleil direct, dans un endroit aéré à température ambiante, jusqu'à poids constant. Chaque tissu a ensuite été broyé en poudre fine.

La poudre est mise à macérer pendant 24 heures à température ambiante dans un mélange méthanol/eau (7:3, v/v). Cette opération est répétée trois fois, en renouvelant le solvant à

chaque fois. Après filtration du mélange, le méthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur à 45 °C (Fig. 3). On obtient ainsi les extraits méthanoliques bruts (notés EM écorce 1, EM écorce 2 et EM résine), qui sont conservés à –4 °C (Tadeg *et al.*, 2005).



Fig. 3 : Rotavapeur utilisé pour la concentration des extraits végétaux.

2.1.2. Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, dont le schéma du dispositif d'extraction est présenté en figure 4. Le principe consiste à immerger la résine sèche dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition à pression atmosphérique. Les molécules odorantes volatiles et semi-volatiles sont alors entraînées par la vapeur d'eau. Ces vapeurs hétérogènes, au contact du froid, se condensent et se liquéfient. Le liquide obtenu est un mélange d'eau et d'huile essentielle aromatique. La séparation est ensuite réalisée par simple différence de densité. L'essence ainsi extraite est collectée dans un flacon en verre fumé stérile, puis conservée à 4 °C (M'hamdi, 2024).



Fig.4. Procédé d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation (clevenger).

2.1.3. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est le rapport entre le poids de l'extrait sec ou de l'HE et le poids de la plante en poudre utilisée. Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante (Daouda, 2015) :

$$\text{Rendement (\%)} = \left(\frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse de l'échantillon initial}}\right) \times 100$$

2.2. Etude phytochimique

2.2.1. Criblage phytochimique qualitatif

Une analyse phytochimique préliminaire a été réalisée sur les extraits méthanoliques bruts afin d'identifier les principales familles de métabolites secondaires présentes. Les tests effectués sont basés sur des réactions de coloration ou de précipitation, spécifiques à chaque groupe de composés.

- ✓ **Tannins**

À 1 mL de filtrat, on ajoute 2 mL d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$) à 1 % (m/v). *et*

al., 2005)

- ✓ **Alcaloïdes (réactif de Mayer)**

Préparation du réactif de Mayer : Dissoudre 1,358 g de chlorure mercurique ($HgCl_2$) dans 60 mL d'eau distillée. Verser cette solution dans une solution contenant 5 g d'iodure de potassium (KI) préalablement dissous dans 10 mL d'eau. Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 100 mL (Bruno & Svoronos, 2012).

Procédure : Ajouter 5 gouttes du réactif de Mayer à 1 mL de filtrat. La formation d'un précipité blanc laiteux ou crème indique la présence d'alcaloïdes (Pandey & Tripathi, 2014).

- ✓ **Saponines**

Dans un tube à essais, 0,5 mL d'extrait sont mélangés à 5 mL d'eau distillée. Le mélange est agité vigoureusement pendant quelques minutes. La formation d'une mousse persistante (stable pendant au moins 15 minutes) confirme la présence de saponines (Dubale *et al.*, 2023).

- ✓ **Anthocyanes**

À 5 mL d'extrait aqueux, on ajoute successivement 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) dilué, puis 5 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH). En milieu acide, une coloration rouge apparaît, tandis qu'en milieu basique, elle vire au bleu violacé. Ce changement de couleur caractéristique révèle la présence d'anthocyanes (Daira *et al.*, 2016).

- ✓ **Terpènes et stéroïdes (test de Salkowski)**

Dans un tube à essais, 5 mL d'extrait sont mélangés à 2 mL de chloroforme. Ensuite, 3 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés lentement et avec précaution en inclinant le tube. L'apparition d'une coloration brun-rougeâtre à l'interface entre les deux phases indique la présence de terpènoïdes et/ou de stéroïdes (Edeoga & Mbaebie, 2005).

- ✓ **Coumarines**

Les résidus secs sont dissous dans 2 mL d'eau distillée sous chauffage modéré. La solution est répartie dans deux tubes à essais. À l'un des tubes, on ajoute 0,5 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 10 % (m/v). Les deux tubes sont observés sous lumière UV à 366

nm. Une fluorescence intense, spécifiquement dans le tube contenant l'ammoniaque, atteste

de la présence de coumarines (EL-Haoud *et al.,* 2018).

- ✓ **Composes réducteurs (test de Keller-Kiliani)**

Procédure :

Ce test met en œuvre la réaction de Keller-Kiliani. À 1 mL d'extrait, on ajoute un mélange de 5 mL d'acide acétique et de 5 mL d'acide sulfurique, tous deux additionnés de traces de $FeCl_3$. Le résultat est positif si l'on observe la formation de deux phases colorées distinctes : une phase supérieure brun-rouge dans l'acide acétique et une phase inférieure bleu-vert dans l'acide sulfurique (Romero, 2005)

2.2.2. Dosage des flavonoïdes (méthode au chlorure d'aluminium)

Principe

La quantification des flavonoïdes a été réalisée en utilisant la méthode au chlorure d'aluminium. Elle repose sur la création d'un complexe stable entre les ions aluminium et les groupes hydroxyle des flavonoïdes (Fig.5). Cela donne une couleur jaune qui peut être mesurée à une longueur d'onde de 430 nanomètres.

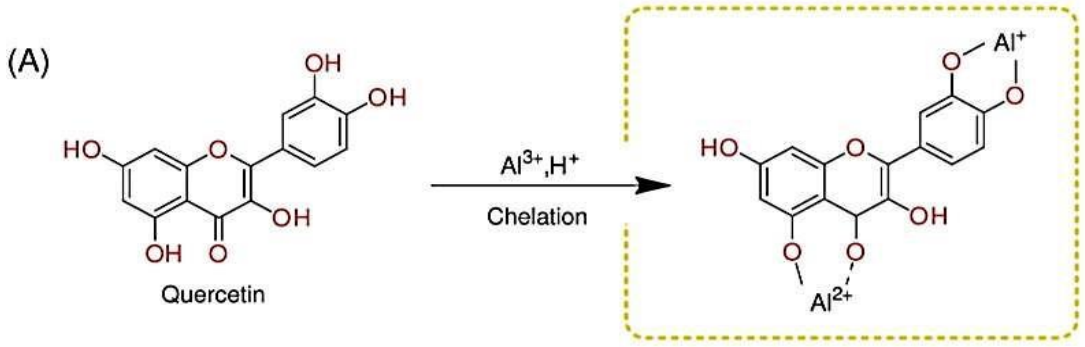


Fig.5. Chélation de la quercétine par les ions aluminium (Al^{3+})

Protocole

1ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d'$AlCl_3$ à 2%. Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation (Khaldi *et al.,* 2025).

Expression des résultats

Une courbe d'étalonnage linéaire (y = ax + b) a été créée en utilisant la quercétine comme référence. Les résultats sont présentés en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait sec (µg EQ/mg d'extrait).

2.3. Évaluation des activités biologiques

2.3.1. Activité antioxydante *in vitro* (Test de piégeage du radical DPPH)

Principe

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre stable grâce à la délocalisation de son électron non apparié sur toute la molécule, ce qui empêche sa dimérisation et lui confère une couleur violette foncée (Fig. 6).

Cette propriété est exploitée pour évaluer l'activité antioxydante d'une substance : lorsqu'un donneur d'hydrogène (AH) réduit le radical DPPH•, il se forme la DPPH-H (jaune pâle). Cette réduction s'accompagne d'une diminution de l'absorbance au pic caractéristique situé entre 515 et 517 nm (Douaouya *et al,. 2022*).

Équation de la réaction : **Z• + AH = ZH + A•**

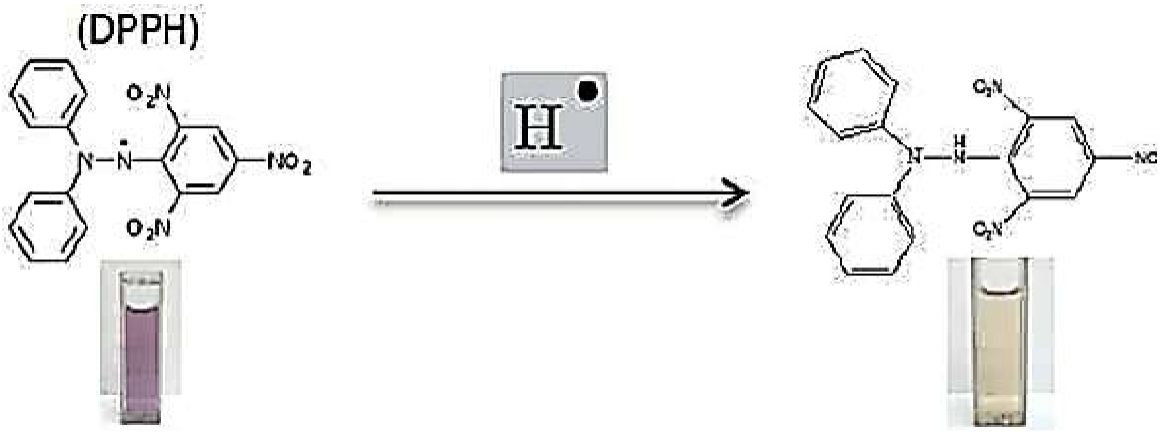


Fig.6. Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux,2004).

Protocole

Une solution de DPPH à 100 µM a été préparée par dissolution dans le méthanol. À partir de la solution mère de chaque extrait (dissous dans le méthanol à une concentration de 0,5 mg/ml), des dilutions appropriées ont été réalisées. Pour chaque essai, 50 µl d'extrait (ou de ses dilutions) ont été mélangés à 1,5 ml de la solution de DPPH. Après agitation vigoureuse, les mélanges ont été incubés à température ambiante pendant 30 minutes, à

l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis. Un témoin (blanc) a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par du méthanol pur. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif pour valider le protocole.

Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\textbf{PI du DPPH•}=[(A_B - A_E)\ /A_B]x100$$

Où :

- A_B : Absorbance initiale de la solution de DPPH (sans antioxydant).
- A_E : Absorbance résiduelle après incubation avec l'extrait antioxydant.

Cette méthode permet d'évaluer l'efficacité des extraits à neutraliser les radicaux libres et de de déterminer la concentration inhibitrice moyenne (IC_{50}), paramètre clé pour comparer la puissance des antioxydants.

2.3.2. Activité anti-inflammatoire (Activité anti-hémolytique)

Principe

L'activité anti-hémolytique des extraits a été évaluée selon la méthode décrite par (Barka *et al.*, 2023), afin d'étudier leur capacité à protéger les érythrocytes humains contre la lyse induite par des agents oxydants.

➢ **Préparation de la suspension érythrocytaire**

- Un prélèvement de 5 ml de sang veineux a été effectué chez un donneur sain, dans un tube contenant un anticoagulant à base d'EDTA.
- Le sang a été centrifugé à 1000 tr/min pendant 5 minutes afin de séparer les globules rouges (culot globulaire) du plasma.
- Le surnageant (plasma) a été éliminé, et le culot globulaire obtenu a été lavé trois fois avec une solution de tampon phosphate salin (PBS) à 0,2 M, pH 7,4 **(Annexe 1).**
- Chaque lavage consistait à suspendre les globules rouges dans le PBS, suivi d'une centrifugation à 1000 tr/min pendant 5 minutes.
- Après le dernier lavage, 0,4 ml du culot globulaire a été dilué dans 9,6 ml de PBS (0,2 M, pH 7,4) afin d'obtenir une suspension érythrocytaire à 4 %

d'hématocrite, utilisée pour le test anti-hémolytique.

- **Préparation des extraits**

Des solutions de chaque extrait ont été préparées dans le tampon phosphate salin (PBS, 0.2 M, pH 7.4) aux concentrations suivantes : 1 mg/ml, 0,5 mg/ml et 0,25 mg/ml. Ces dilutions ont été utilisées pour évaluer l'effet dose-dépendant des extraits sur la protection des érythrocytes contre l'hémolyse.

- **Protocole expérimental**

L'évaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits a été réalisée selon les étapes suivantes :

1. Préparation du mélange réactionnel : dans chaque tube à essai, 1 ml de la suspension érythrocytaire à 4 % a été mélangé avec 0,5 ml d'extrait (préparé dans le tampon PBS) à différentes concentrations (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml).
2. Incubation : les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 20 minutes afin de permettre l'interaction entre les composés bioactifs et les membranes érythrocytaires.
3. Induction de l'hémolyse : après incubation, 0,5 ml de solution de NaCl à 2 %, diluée dans du PBS, a été ajoutée à chaque tube.
4. Centrifugation : les échantillons ont été centrifugés à 1000 tr/min pendant 10 minutes.
5. Mesure de l'hémolyse : le surnageant contenant l'hémoglobine libérée a été soigneusement récupéré, puis l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
6. Calcul de l'hémolyse relative : le pourcentage d'hémolyse a été déterminé en comparant les résultats obtenus avec ceux du contrôle négatif (échantillon traité uniquement avec NaCl 2 % sans extrait). Une diminution de l'absorbance indique une protection membranaire assurée par l'extrait testé.

- **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé afin d'évaluer l'effet protecteur des extraits sur les globules rouges. Le calcul repose sur la différence d'absorbance entre le contrôle négatif (NaCl 2 % sans extrait) et les échantillons traités avec les extraits selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left(\frac{A_c - A_{ext}}{A_c}\right) \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle négatif (solution de NaCl 2 % sans extrait)
Aext: absorbance de la solution contenant l'extrait

2.3.3. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de résine ainsi que celle des extraits méthanoliques des écorces de *Pinus halepensis* Mill. ont été évaluées par deux méthodes distinctes : la méthode de diffusion sur disque et la méthode de microdilution en bouillon. Cette dernière a été mise en œuvre pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

1) Méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme)

Principe

L'activité antibactérienne des extraits a été évaluée selon la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé, une technique standardisée pour l'étude de la sensibilité bactérienne Cette approche consiste à déposer un disque de papier imprégné de l'extrait testé sur un milieu nutritif solide préalablement ensemencé avec la souche bactérienne cible. L'agent antibactérien diffuse radialement dans la gélose, inhibant la croissance des micro-organismes sensibles. L'activité est quantifiée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (halo clair autour du disque), exprimé en millimètres. Les résultats sont interprétés selon les critères du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ou de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), selon le protocole utilisé (Khameneh *et al.*, 2023).

Repiquage des souches bactériennes

Les souches bactériennes de référence ont été étalées sur une gélose Mueller Hinton par stries, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Cela a permis d'obtenir des colonies isolées, qui ont ensuite été utilisées pour préparer l'inoculum (Fig. 7).

Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum bactérien a été préparé dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile. A partir d'une culture pure de 24 heures, comme recommandé par le CA-SFM. La densité a été ajustée à 0,5 Mac Ferland (Annexe 2).(Amara *et al.*, 2023)



Fig. 7 : Préparation de l'inoculum bactérien

Ensemencement

Il est nécessaire d'effectuer l'ensemencement en moins de 15 minutes après la préparation de l'inoculum. Les étapes de l'ensemencement illustrées dans la figure 8 sont les suivantes (Marlène *et al.*,2022) :

• Ajouter 20 ml de la gélose Muller-Hinton (Annexe 3) à chaque boîte de pétri, puis laisser prendre soin de la solidification.

• Insérer un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, le presser fermement et le tourner sur la paroi interne du tube pour le décharger à son maximum.

• Appliquer l'écouvillon sur toute la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en laissant des stries serrées.

• Effectuer cette opération à deux reprises, en tournant la boîte de pétri à 60° à chaque fois, en évitant de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.

• Terminer le processus d'ensemencement en passant l'écouvillon sur la zone entourant la gélose.



Fig. 8 : Ensemencement des boîtes de Pétri

Préparation des disques d'aromatogramme

Les étapes de préparation des disques d'aromatogrammes en présence de l'HE sont illustrées dans (**Fig.9)** comme suit :

- Stériliser du papier Wattman n°3 coupés en disques de 6mm de diamètre à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes
- À l'aide d'une pince stérile déposé au centre de chaque moitié de la boite pétri un disque stérile de papier filtre.
- À l'aide d'une micropipette, ajouté15µl d'HE ou d'extrait.

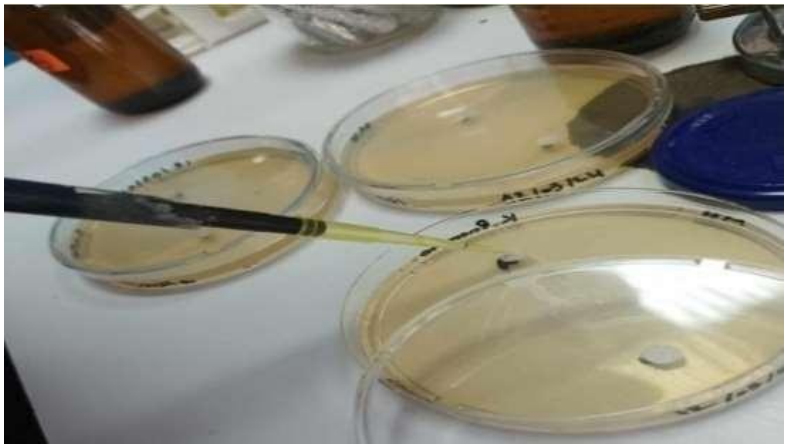


Fig. 9 : Préparation des disques d'aromatogrammes en présence des extraits.

Incubation et lecture

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés autour des disques, comme indiqué à la figure 10.

Après une pré-incubation de 30 minutes à température ambiante, les disques ont été incubés a l'étuve à 37°C pendant 24 heures.**(Aouadhi *et al.*, 2024**). Les souches ont été classées en fonction de leur diamètre (Tab. 2).

Tab. 2. Critères d'interprétation des zones d'inhibition(Celikel & Kavas, 2008)

Diamètre d'inhibition (mm)	Sensibilité
< 8 mm	Résistante (−)
9 – 14 mm	Sensible (+)
15 – 19 mm	Très sensible (++)
≥ 20 mm	Extrêmement sensible (+++)



Fig.10. Mesure du diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse numérique.

2) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) — Microdilution en bouillon

La méthode de micro-dilution (Fig. 11) a été utilisée pour évaluer la concentration minimale inhibitrice. Cette concentration minimale inhibitrice correspond à la quantité minimale d'huile essentielle et des extraits nécessaire pour empêcher la croissance de la population bactérienne. Cette évaluation a été réalisée en utilisant le bouillon Muller Hinton dans des microplaques à fond en U (Hulankova, 2024).

Protocole

- 125µl du bouillon Muller Hinton ou additionné de Tween 80 (0,5%) v/v (pour l'HE) ont été répartis dans tous les puits de la microplaque.
- 15 µl d'extrait et d'HE ont été déposés dans les premiers puits de la microplaque Ensuite, une dilution progressive de 2 fois a été réalisée, à partir du deuxième puits de chaque ligne, jusqu'à la dernière dilution de la même ligne.
- Les microplaques ont été inoculées avec 10 µl de la suspension bactérienne, qui avait été diluée au 1/10ème, pour obtenir un volume final de 150 µl.
- Pour chaque expérience, nous avons préparé un contrôle positif, qui est un milieu inoculé, et un contrôle négatif, qui est un milieu avec extrait ou HE**.**
- Les microplaques préparées ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, la croissance bactérienne, qui se traduit par une turbidité, a été examinée dans chaque puits. La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) des extraits et d'HE vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite concentration qui ne montre aucune croissance visible de germe (Nikol Kadeřábková *et al.*, 2024).



Fig. 11 : Protocole de microdilution en microplaque pour la détermination de la CMI des extraits et de l'huile essentielle.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude phytochimique

1.1. Rendement d'extraction

Le tableau 3 présente les résultats d'étude portant sur l'extraction de molécules bioactives à partir de différentes parties du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) récolté dans la région d'El Khazoum-Bouhmama (Khenchela). Deux méthodes d'extraction ont été utilisées : une macération hydro-méthanique à froid (eau/méthanol 7:3, v/v) pour les écorces et la résine, et une hydrodistillation pour l'obtention de l'huile essentielle à partir de la résine.

Matériel végétal	Poids initial (g)	Poids/ Volume d'extraction	Rendement en (%)
EM écorce 1	200	56 g	28
EM écorce 2	200	48 g	24
EM résine	50	13 g	26
Huile essentielle	50	3 mL	6

Tab 3. Rendement de l'extraction

Les rendements obtenus pour les écorces (24–28 %) sont remarquablement élevés et cohérents avec les données récentes de la littérature. Chammam *et al.* (2024) ont rapporté des rendements de 12,52 % pour les pétales de cônes de *P. halepensis* extraits au méthanol, soulignant que les fractions riches en composés polaires (3SV) présentent systématiquement les meilleurs rendements. Les valeurs observées dans le tableau sont même supérieures, ce qui pourrait s'expliquer par la nature de la matrice (écorces vs. cônes) et par l'utilisation d'un mélange eau/méthanol optimisé, Toutefois, cette comparaison doit être interprétée avec prudence en raison de la différence des matrices végétales étudiées (écorces et cônes), lesquelles présentent des compositions chimiques et des structures tissulaires distinctes susceptibles d'influencer significativement le rendement d'extraction.

La légère variation entre les deux échantillons d'écorce (28 % vs. 24 %) reflète probablement une hétérogénéité du matériel végétal (âge de l'arbre, exposition, localisation sur le tronc). Selon Jović *et al.* (2026), les conditions bioclimatiques, la composition du sol et la variabilité génétique influencent significativement la teneur en composés phénoliques chez les espèces du genre *Pinus*

Le rendement de 26 % pour la résine est particulièrement intéressant. Chammam *et al.* (2025) ont montré que les extraits de pétales de cônes de *P. halepensis* obtenus par extraction supercritique au CO2 permettaient de récupérer environ 80 % des composés bioactifs dans les 30 premières minutes, démontrant le potentiel d'extraction élevé de cette espèce.

La littérature rapporte que la résine de *P. halepensis* peut contenir des acide caféiques, acides isoferuliques et composés aromatiques, qui constitue une matrice particulièrement propice à l'extraction de molécules polaires.

Le rendement de 6 % en huile essentielle obtenu par hydrodistillation de la résine est nettement supérieur aux valeurs rapportées dans la littérature et données récentes. En effet, une étude comparative de 2024 sur les huiles essentielles de *P. halepensis* tunisien a rapporté des rendements de seulement 0,91 % par hydrodistillation et 0,32 % par extraction assistée par micro-ondes (MAE) à partir des aiguilles. Cette différence de rendement s'explique par la nature de la matrice : la résine est intrinsèquement riche en composés volatils terpéniques, contrairement aux aiguilles où ces molécules sont diluées dans une matrice cellulosique plus importante.

Les travaux récents confirment que la composition des huiles essentielles de *P. halepensis* varie considérablement selon la méthode d'extraction, la partie de la plante utilisée et les facteurs environnementaux. Le rendement de 6 % observé ici suggère que la résine de la région de Khenchela constitue une source particulièrement concentrée en composés volatils, probablement en lien avec les conditions climatiques arides du Hauts-Plateaux algériens qui favorisent la biosynthèse de ces molécules de défense.

La macération hydro-méthanique à froid s'est avérée très efficace pour l'extraction des composés polaires (polyphénols, tanins, acides phénoliques). L'utilisation d'un mélange eau/méthanol (7:3) permet une extraction optimale des molécules amphiphiles tout en préservant la stabilité des composés thermosensibles. Chammam *et al.* (2024) ont démontré que les extraits au méthanol (3SV) présentaient la plus forte teneur en polyphénols totaux (jusqu'à 460,66 mg EAG/g de matière sèche pour *P. halepensis*) et la meilleure activité antioxydante.

L'hydrodistillation, méthode de référence pour les huiles essentielles, a permis d'obtenir un rendement six à dix fois supérieur à celui rapporté pour les aiguilles dans les études récentes

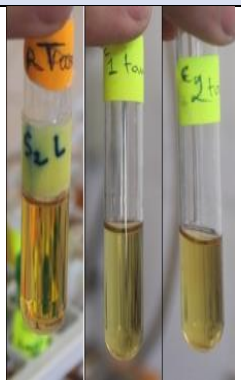
. Cette performance exceptionnelle ouvre des perspectives prometteuses pour la valorisation de la résine de *P. halepensis* dans l'industrie des arômes et des fragrances, ainsi que dans le domaine pharmaceutique compte tenu des propriétés cytotoxiques démontrées récemment contre les lignées cellulaires cancéreuses (PC3, LNCaP, HeLa).

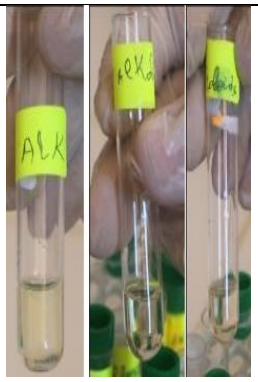
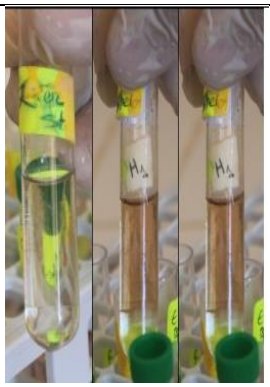
Les résultats présentés dans ce tableau mettent en évidence le potentiel remarquable du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de la région d'El Khazoum-Bouhmama comme source de molécules bioactives. Les rendements d'extraction élevés — particulièrement le 6 % en huile essentielle par hydrodistillation de la résine, bien supérieur aux 0,32–0,91 % rapportés récemment pour les aiguilles — confirment que la résine constitue la matrice la plus riche en composés volatils. Les rendements de 24–28 % pour les écorces et 26 % pour la résine en macération hydro-méthanique sont également élevés, en accord avec les travaux de Chammam *et al.* (2024, 2025) sur les cônes de *P. halepensis*. Ces résultats soutiennent la valorisation de ces sous-produits forestiers dans le cadre d'une économie circulaire, en accord avec les principes de la chimie verte. Les extraits obtenus pourraient trouver des applications dans les industries pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire, notamment en tant qu'agents antioxydants, antimicrobiens ou anticancéreux naturels, comme l'ont démontré les études récentes sur les espèces du genre *Pinus*.

1.2. Criblage phytochimique

Les résultats qualitatifs sont synthétisés dans le Tableau 4. Pour chaque famille chimique, le réactif utilisé, l'observation caractéristique attendue et le résultat obtenu pour chaque compartiment (résine, écorce moyenne, écorce interne) sont présentés. La présence (+) ou l'absence (−) ont été confirmées sur les trois répétitions avec concordance totale.

Tab. 4. Analyse phytochimique préliminaire des extraits de *Pinus halepensis* Mill.

Groupe chimique	Réactifs / tests	Observation	EM résine	EM écorce 1	EM écorce 2
Tanins	Chlorure ferrique (FeCl3)		+	+	+

Flavonoïdes	Test au NaOH		–	+	+
Saponines	Indice de mousse		–	–	–
Alcaloïdes	Réactif de Mayer		–	–	–
Stéroïdes et terpènes	H_2SO_4 + chloroforme (Salkowski)		+	+	+

Composés réducteurs	Liqueur de Fehling + chauffage		–	+	+
Anthocyanes	HCl (2N) + NH_4OH		–	–	–
Coumarines	NaOH 10 %	Absence de fluorescence jaune-verte sous UV 366 nm	–	–	–

Le criblage phytochimique constitue effectivement une étape préliminaire indispensable pour l'orientation des recherches sur les plantes médicinales. L'approche, consistant à tester trois compartiments distincts (résine, écorce moyenne, écorce interne) avec des réactifs standardisés, s'inscrit dans une démarche rigoureuse recommandée par la littérature contemporaine. Mathe *et al.* (2024) ont récemment souligné que le criblage phytochimique qualitatif, couplé à des techniques analytiques comme la GC-MS, permet d'identifier des métabolites secondaires à propriétés anticancéreuses et antioxydantes dans les plantes médicinales sud-africaines. Dans ce travail, l'absence de saponines, d'alcaloïdes, de anthocyanes et de coumarines chez *P. halepensis* oriente les perspective d'étude vers les familles chimiques effectivement détectées : tanins, flavonoïdes, stéroïdes/terpènes et Composés réducteurs .

Nos résultats sont cohérents avec les données récentes sur le genre *Pinus*. Une étude de 2025 sur *Pinus nigra* subsp. *laricio* a montré que les cônes mâles et femelles de cette espèce renferment des polyphenols, flavonoïdes et terpènes, avec des propriétés antioxydantes et cytoprotectrices. Les auteurs précisent que les espèces du genre *Pinus* représentent un réservoir significatif de métabolites secondaires, notamment des composés phénoliques et des tanins, dont la composition varie selon la partie de la plante et la méthode d'extraction.

La présence de tanins dans les trois compartiments, combinée à celle de flavonoïdes et Composés réducteurs dans l'écorce (moyenne et interne), suggère que les tissus corticaux de *P. halepensis* constituent une source riche en polyphénols. Cela corrobore les travaux récents sur

Pinus pinea et *P. pinaster*, qui ont mis en évidence une forte teneur en polyphénols totaux dans l'écorce, avec des activités antioxydantes (DPPH, ABTS) comparables à des standards connus, ainsi qu'une action bactéricide contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*

La détection de stéroïdes et terpènes dans les trois compartiments, via le test de Salkowski, est particulièrement significative. Une étude de 2025 sur *Pinus pinea* a révélé la présence de métabolites secondaires dans les aiguilles, notamment des acides gras et des terpénoides, soulignant l'importance de ces composés dans la défense chimique des conifères. Les terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes) et les acides résiniques sont des composants des défenses constitutives contre les ravageurs et pathogènes ; les acides résiniques non volatils participent aux défenses directes (réduction de la palatabilité pour les herbivores, cicatrisation des blessures), tandis que les monoterpènes volatils interviennent dans les défenses directes et indirectes.

Le test au NaOH n'a pas révélé de flavonoïdes dans la résine (Tableau 4). Toutefois, le dosage quantitatif a permis de détecter une teneur résiduelle très faible (0,685 µg EQ/mg d'extrait), inférieure au seuil de détection du test colorimétrique qualitatif. Cette cohérence apparente souligne la complémentarité des deux approches : le criblage qualitatif permet une orientation rapide, tandis que la spectrophotométrie révèle des teneurs très faibles non décelables à l'œil nu. La quasi-absence de flavonoïdes dans la résine pourrait ainsi refléter une spécialisation métabolique de ce compartiment vers la biosynthèse de terpènes et de composés résiniques, plutôt que de flavonoïdes.

L'absence d'alcaloïdes, de saponines, des anthocyanes et de coumarines chez *P. halepensis* mérite d'être discutée. Khedr *et al.* (2024), dans leur criblage de plantes médicinales sauvages égyptiennes, ont montré que la présence ou l'absence de certaines familles chimiques conditionne directement le potentiel thérapeutique et la cytotoxicité des extraits. Par exemple, *Nicotiana glauca*, riche en alcaloïdes (anabasine, nicotine), présentait une activité antioxydante et antimicrobienne élevée mais aussi une certaine cytotoxicité. L'absence d'alcaloïdes chez *P. halepensis* pourrait donc être interprétée comme un atout en termes de sécurité d'emploi, bien que cela limite certaines applications pharmacologiques.

Notre criblage qualitatif gagnerait à être complété par des analyses quantitatives et des techniques chromatographiques. Mathe *et al.* (2024) recommandent d'associer le criblage phytochimique classique à la GC-MS pour la caractérisation des composés volatils, et à la LC-MS ou HPLC pour les composés polaires. Cette approche a permis d'identifier 19 composés volatils bioactifs chez *Annona senegalensis*, *Sutherlandia frutescens* et *Withania somnifera*. Pour *P. halepensis*, une telle démarche permettrait d'identifier précisément les flavonoïdes et anthocyanes de l'écorce, ainsi que les terpènes spécifiques de la résine.

Par ailleurs, une étude récente sur *Carthamus caeruleus* (plante endémique algérienne, 2025) a montré que le fractionnement bioguidé à partir d'extraits obtenus avec des solvants de polarités différentes permet d'isoler des composés bioactifs (polyphénols, terpènes) et d'évaluer leurs activités antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne. La fraction dichlorométhane de cette étude présentait une activité antioxydante remarquable (IC_{50} < 0,195 µg/mL) et une inhibition des monoxydes d'azote de 100 %, illustrant l'intérêt de combiner criblage qualitatif et fractionnement pour la découverte de molécules actives.

En résumé, le criblage phytochimique de *Pinus halepensis* Mill. révèle un profil riche en tanins, flavonoïdes, stéroïdes/terpènes et composes réducteurs , avec une distribution différenciée selon les compartiments végétaux. Ces résultats s'inscrivent dans la continuité des travaux récents sur le genre *Pinus*, qui mettent en évidence le potentiel fonctionnel des extraits d'écorce et de résine en tant que sources de polyphénols et de terpènes. La prochaine étape consisterait à quantifier ces familles chimiques et à évaluer leurs activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire) afin de valider pleinement la valorisation thérapeutique de cette espèce dans le contexte algérien

1.3. Analyse quantitative (Dosage des flavonoïdes)

Les flavonoïdes ont été quantifiés par étalonnage avec une solution de quercétine ($y = ax + b$) (Fig. 12), et les résultats sont exprimés en **µg EQ/mg d'extrait,** reflétant leur teneur relative (Fig.13).

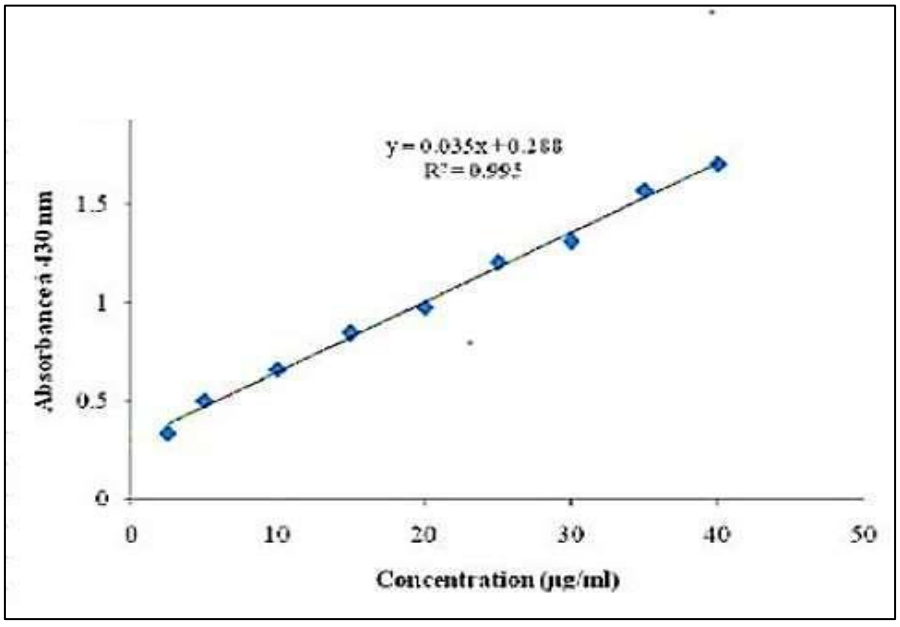


Fig. 12. Courbe d'étalonnage de la quercétine

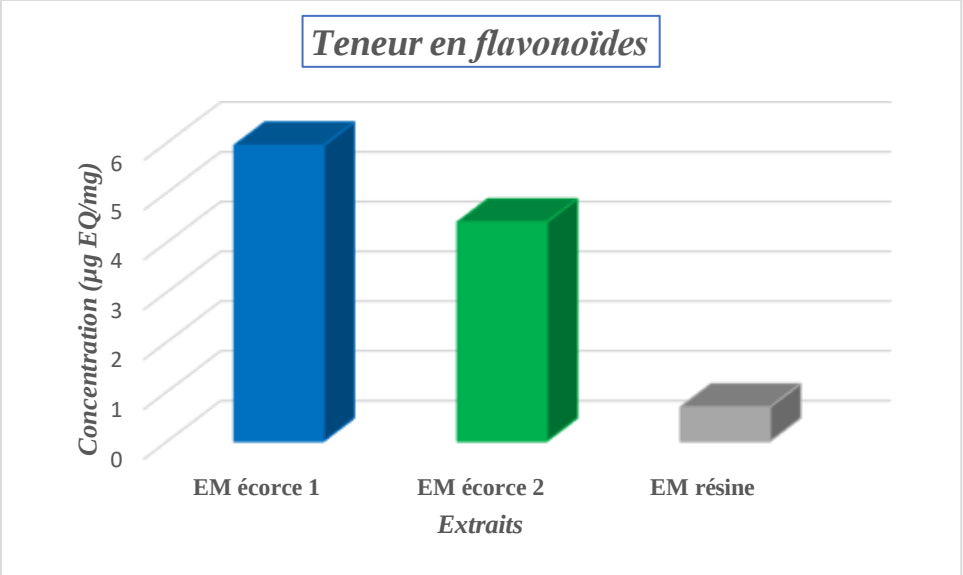


Fig. 13. Teneur en flavonoïdes des extraits du Pin d'Alep

Le graphe révèle une hiérarchie nette des teneurs en flavonoïdes selon les organes étudiés. L'écorce moyenne présente la concentration la plus élevée avec une valeur de 5,940 µg EQ/mg d'extrait, suivie de l'écorce interne à 4,400 µg EQ/mg d'extrait, tandis que la résine affiche une teneur très faible de 0,685 µg EQ/mg d'extrait. Cette distribution n'est pas fortuite : elle reflète fidèlement la physiologie de l'arbre et le rôle défensif des flavonoïdes dans les tissus végétaux. L'écorce externe et moyenne, directement exposée aux agressions environnementales telles que les rayonnements UV, les attaques de pathogènes fongiques et bactériens, ainsi que les herbivores, synthétise naturellement davantage de composés phénoliques à vocation protectrice. À l'inverse, l'écorce interne, moins soumise à ces stress, présente une activité métabolique réduite en termes de biosynthèse flavonoïdique. La résine, quant à elle, constitue un compartiment métabolique spécialisé dans la production de terpènes et de composés résiniques, expliquant sa pauvreté relative en flavonoïdes. Sur le plan quantitatif, l'écorce moyenne contient environ huit fois plus de flavonoïdes que la résine et un tiers de plus que l'écorce interne.

Les travaux de Salhi *et al.* (2021) ont étudié les activités antioxydante et antidiabétique *in vitro* et *in vivo* des extraits de *Pinus halepensis* du Maroc. Ces auteurs ont rapporté des teneurs en flavonoïdes de 738,97 ± 1,39 mg d'équivalent rutine par gramme pour l'extrait aqueux et 865,40 ± 12,10 mg RE/g pour l'extrait éthanolique de l'écorce. Bien que ces valeurs, mesurées avec d'autres solvants, ne soient pas directement comparables aux nôtres, elles confirment le potentiel phénolique élevé de l'écorce de cette espèce. Par ailleurs, Salhi *et al.* (2021) ont démontré que ces extraits présentaient des activités antioxydantes remarquables avec des valeurs d'IC_{50} sur le radical DPPH de 3,10 ± 0,42 µg/mL pour l'extrait aqueux et 3,28 ± 0,37 µg/mL pour l'extrait éthanolique, ainsi que des pouvoirs réducteurs du

fer (FRAP) significatifs. Ces performances sont directement corrélées à la richesse de l'écorce en flavonoïdes et polyphénols totaux.

Dans une étude portant sur les aiguilles de cinq espèces de pin du Monténégro, Gavrilović *et al*. (2026), publiés dans la revue *Microorganisms*, ont quantifié la teneur totale en flavonoïdes de *Pinus halepensis* à 1,074 mg/g d'équivalent quercétine par extraction assistée par ultrasons. Ces auteurs soulignent l'importance cruciale de la méthode d'extraction sur le rendement en flavonoïdes, l'extraction assistée par ultrasons permettant d'obtenir des teneurs supérieures à celles de la macération conventionnelle. Cette observation est particulièrement pertinente pour interpréter nos résultats obtenus par extraction méthanolique, une méthode reconnue pour son efficacité à solubiliser les flavonoïdes glycosylés et aglycones.

La revue exhaustive de Bouyahya *et al.* (2021), consacrée aux activités phytochimiques et biologiques de *Pinus halepensis* ainsi qu'à ses usages ethnomédicinaux, confirme que cette espèce est riche en flavonoïdes, acides phénoliques, protéines et acides gras. Ces auteurs documentent une large gamme d'activités biologiques incluant antioxydante, antibactérienne, antifongique, cytotoxique et anticoagulante, toutes corrélées à la présence de ces métabolites secondaires. Cette revue constitue une référence majeure pour comprendre le potentiel thérapeutique global de l'espèce.

Concernant spécifiquement l'influence du solvant d'extraction, Salim *et al.* (2019) ont comparé différents solvants sur *Pinus halepensis* de Palestine. Leurs résultats montrent que l'extrait méthanolique de cônes présentait la meilleure teneur en flavonoïdes avec 193,25 mg d'équivalent catéchine par gramme d'extrait, ainsi que la plus forte activité antioxydante avec une valeur d'EC_{50} de 1,48 µg/mL. Cette étude valide le choix du méthanol comme solvant d'extraction dans notre protocole expérimental.

Enfin, une étude comparative sur les huiles essentielles de *Pinus halepensis* de Tunisie par Zrelli *et al.* (2025), a mis en évidence la richesse en terpènes de la résine, notamment en β-caryophyllène et α-pinène, confirmant ainsi la spécialisation métabolique de ce compartiment vers d'autres familles de composés que les flavonoïdes. Cette observation corrobore parfaitement nos résultats montrant une teneur très faible en flavonoïdes dans la résine.

La teneur en flavonoïdes chez *Pinus halepensis* varie selon plusieurs facteurs bien documentés dans la littérature. La partie végétale constitue le premier facteur déterminant, avec généralement l'ordre suivant : écorce supérieure à aiguilles, aiguilles supérieures à cônes, et cônes supérieurs à résine. Le solvant d'extraction joue également un rôle majeur, le mélange méthanol-eau à 80% s'avérant généralement plus efficace que l'éthanol pur ou l'eau seule pour l'extraction des flavonoïdes. La méthode d'extraction elle-même influence considérablement les rendements, l'extraction assistée par ultrasons dépassant souvent la macération classique et l'extraction Soxhlet. La localisation géographique, incluant les conditions climatiques, l'altitude et le stress hydrique, modifie également

la biosynthèse des métabolites secondaires. Enfin, la saison de récolte affecte les teneurs, les périodes de stress environnemental favorisant généralement l'accumulation de composés phénoliques.

Les résultats obtenus sur les extraits méthanoliques de *Pinus halepensis* de Khenchela permettent de tirer plusieurs conclusions. Premièrement, l'écorce moyenne constitue la matrice la plus riche en flavonoïdes avec une valeur de 5,940 µg EQ/mg d'extrait, suggérant son intérêt privilégié pour l'extraction de ces métabolites à visée antioxydante ou pharmaceutique. Deuxièmement, l'écorce interne reste une source appréciable avec 4,400 µg EQ/mg d'extrait, bien que moins performante que l'écorce moyenne. Troisièmement, la résine est dépourvue d'intérêt pour l'extraction de flavonoïdes avec seulement 0,685 µg EQ/mg d'extrait, sa valeur résidant plutôt dans sa richesse en terpènes comme documenté par les études sur les huiles essentielles de cette espèce. Ces résultats s'inscrivent dans la continuité des travaux récents sur la phytochimie de *Pinus halepensis* et confirment le potentiel biotechnologique de l'écorce de cette espèce méditerranéenne, notamment pour le développement d'extraits naturels à activité antioxydante et antidiabétique.

2. Etude des activités biologiques

2.1. Évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de plantes médicinales représente une étape importante dans l'étude de leurs propriétés biologiques. Parmi les différentes méthodes utilisées, le test du DPPH est l'une des techniques les plus employées pour déterminer la capacité des extraits végétaux à neutraliser les radicaux libres. Cette méthode est largement utilisée en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de sa sensibilité.

Cette réaction se traduit Visuellement par un changement de coloration de violet à jaune, quantifié par Spectrophotométrie à 517 nm, Les résultats montrent que tous les extraits méthanoliques présentent une activité antioxydante dose-dépendante contre le radical DPPH (Fig. 14).
L'activité augmente avec la concentration, ce qui est cohérent avec le mécanisme de piégeage des radicaux libres par les composés phénoliques

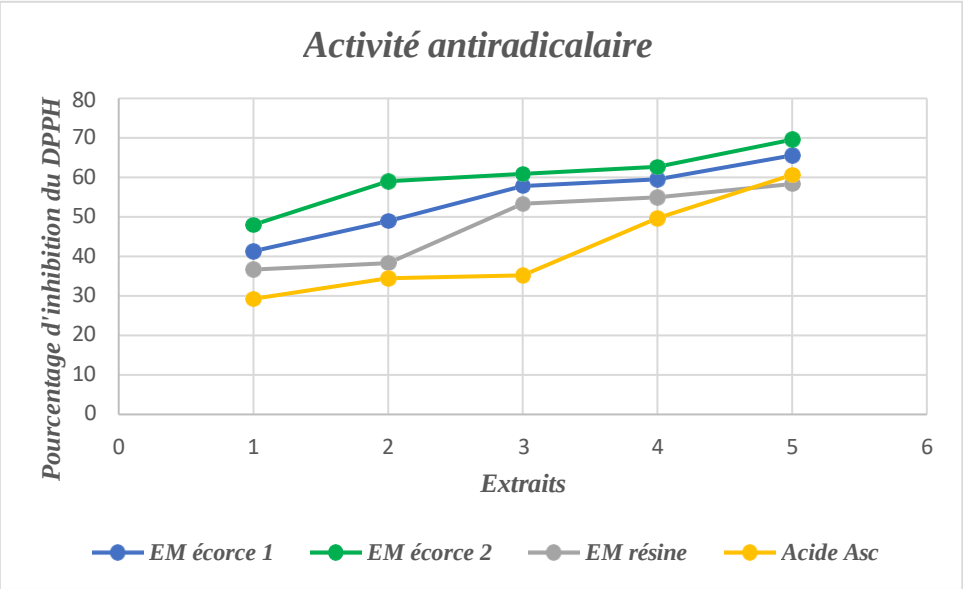


Fig. 14. Activité antiradicalaire des extraits du pin d'Alep

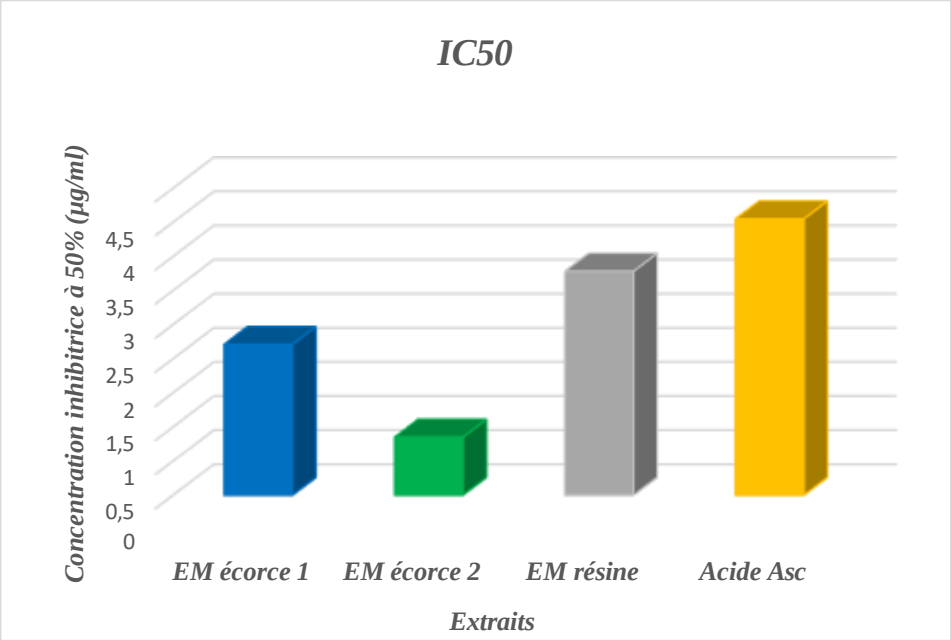


Fig. 15. IC50 des extraits du pin d'Alep inhibant le DPPH

L'IC_{50} (concentration inhibitrice à 50%) est l'indicateur le plus fiable : plus elle est faible, plus l'activité est forte (Fig. 15).

Avec une IC_{50} de 0,85 mg/mL (850 µg/mL), l'écorce interne présente la plus forte activité antioxydante, dépassant largement l'acide ascorbique. Cela s'explique par une richesse en composés phénoliques et flavonoïdes dans les couches internes de l'écorce, où la biosynthèse secondaire est plus

active pour la défense de l'arbre. L'écorce interne contient généralement plus de tannins condensés et de procyanidines, connus pour leur forte capacité de piégeage radicalaire.

avec une IC_{50} de 2,21 mg/mL(2210 µg/mL). l'écorce moyenne présente une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique, qui est utilisé comme référence. Il est intéressant de noter que la teneur en flavonoïdes est plus élevée dans l'écorce moyenne que dans l'écorce interne. Cela suggère que l'activité antioxydante de l'écorce moyenne ne dépend pas uniquement de la quantité de flavonoïdes qu'elle contient, mais également de la nature chimique de ces flavonoïdes et de leur biodisponibilité.

L'augmentation de la valeur d'$IC_{50\ d'ecorce\ moyenne}$ par rapport à l'écorce interne pourrait être liée à la composition qualitative des autres métabolites secondaires présents. Les tanins et les composés phénoliques non flavonoïdiques présents dans l'écorce interne ont une efficacité antiradicalaire qui peut varier. Un effet synergique moins marqué entre les différents constituants bioactifs, tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques, pourrait également contribuer à cette différence d'activité. La combinaison de ces facteurs pourrait donc expliquer pourquoi la valeur d'IC_{50} est plus élevée pour l'écorce moyenne.

Avec une IC_{50} de 3.28 mg/mL(3280 µg/mL), la résine est moins active que les écorces mais reste supérieure à l'acide ascorbique. La résine de pin est riche en acides résiniques (acide abietique, acide pimarique) et en terpènes, dont l'activité antioxydante est généralement plus modérée que celle des polyphénols, mais elle présente d'autres propriétés biologiques (antimicrobienne, anti-inflammatoire) complémentaires.

Zerroug *et al. (*2021) ont étudié un extrait lyophilisé aqueux de résine de *P. halepensis* d'Algérie et ont trouvé une inhibition DPPH de 93.76% à 300 µg/mL avec une IC_{50} de 83.64 µg/mL (0.084 mg/mL).

La résine (IC_{50} = 3.28 mg/mL=3280 µg/mL) est moins active, ce qui peut s'expliquer par la méthode d'extraction (méthanol vs. eau) et la préparation de l'échantillon.

Hamad & Altaiaf (2021) ont rapporté une inhibition DPPH de 66.8% pour des extraits d'écorce de *P. halepensis* de Libye , ce qui est comparable à nos résultats pour l'écorce 1 (65,57 % à 5 mg/mL), Cette valeur d'inhibition est globalement cohérente avec nos résultats. Cependant, la comparaison directe est limitée en raison des différences dans les méthodes utilisées, notamment entre l'IC_{50} et le pourcentage d'inhibition.

Costa *et al.* (2022) ont étudié les écorces de *Pinus pinaster* et *Pinus pinea* du Portugal et ont trouvé des IC_{50} DPPH de 6.46 et 6.79 µg/mL respectivement pour des extraits polaires, avec l'acide ascorbique à 3.96 µg/Ml.

Nos valeurs d'IC_{50} sont plus élevées, ce qui suggère que nos extraits sont moins concentrés en composés actifs ou que les conditions expérimentales diffèrent (notamment la nature de solvant , la concentration initiale en DPPH et le temps d'incubation).

Chammam *et al.* (2024) ont évalué les cônes de *P. halepensis*, *P. brutia* et *P. pinea* et ont trouvé des IC_{50} DPPH de 14.16 µg/mL pour *P. halepensis* avec du méthanol.

Ces résultats corroborent l'utilisation traditionnelle de l'écorce et de la résine de pin d'Alep dans la médecine populaire algérienne pour leurs propriétés protectrices

.

2.2. Évaluation de l'Activité anti-inflammatoire (antihémolytique)

. L'évaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits du pin d'Alep a été réalisée selon la méthode de protection des érythrocytes contre l'hémolyse induite par une solution hypotonique (NaCl). Cette approche permet d'évaluer la capacité des composés bioactifs à stabiliser les membranes cellulaires et à prévenir la lyse cellulaire (Fig. 16).

Les membranes des globules rouges humains (HRBC) sont similaires aux membranes lysosomales en termes de composition lipidique et de propriétés physiques ; ainsi, l'inhibition de l'hémolyse induite par hypotonicité et chaleur est considérée comme une modele *in vitro* permettent d'évaluer le potentiel anti-anflammatoire

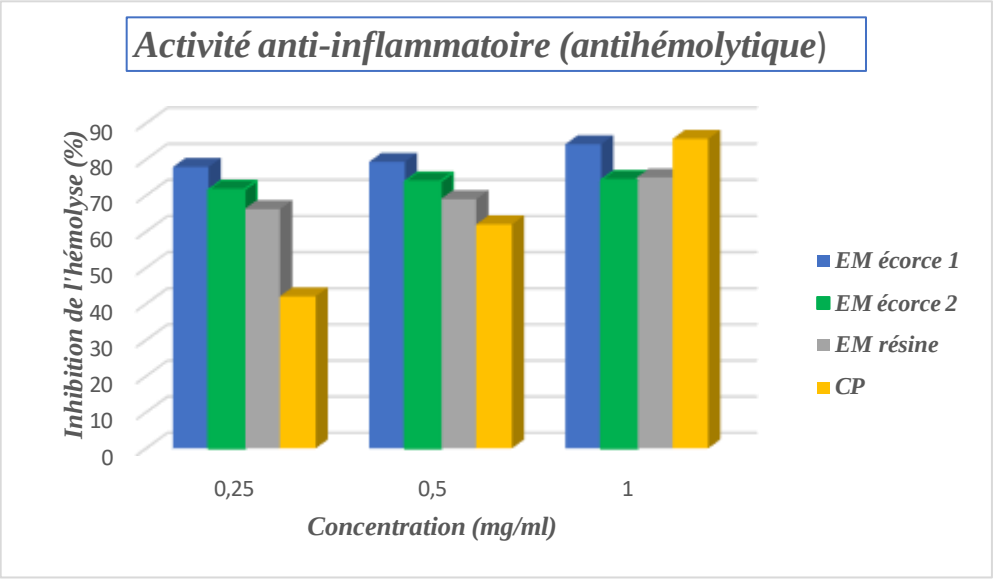


Fig. 16. Activité anti-inflammatoire des extraits du pin d'Alep

Le test de stabilisation membranaire des globules rouges constitue un modèle *in vitro* validé et largement utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits végétaux. La membrane érythrocytaire présente en effet une structure et une composition chimique analogues à celles

de la membrane lysosomale. Par conséquent, la capacité d'un composé à stabiliser la membrane des globules rouges face à un stress hypotonique reflète sa capacité à prévenir la rupture des lysosomes dans les cellules inflammatoires in vivo. Lors de l'inflammation, l'altération des membranes lysosomales libère leurs enzymes hydrolytiques dans le cytosol, notamment les phospholipases, les protéases et les hyaluronidases. Cette libération entraîne la peroxydation lipidique et la production d'espèces oxydantes, activant les protéines responsables de l'inflammation et

Les mécanismes moléculaires par lesquels les extraits végétaux exercent leur activité anti-hémolytique sont multiples. Ils incluent la stabilisation des phospholipides membranaires par insertion de molécules amphiphiles telles que les flavonoïdes et les tanins, la chélation des ions métalliques qui catalysent la peroxydation lipidique, l'inhibition de la phospholipase A2 qui est l'enzyme clé dans la libération d'acide arachidonique et la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, ainsi que le piégeage des radicaux libres générés lors du stress hypotonique.

Rahal et collaborateurs, dans une étude publiée en 2026, ont démontré que les extraits d'écorce de *Pinus halepensis* possèdent une activité anti-inflammatoire significative atteignant 86,15 % pour l'extrait méthanolique. Cette activité a été attribuée à la richesse de ces extraits en acide quinique et en acide protocatéchique, identifiés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Cette étude corrobore nos résultats en montrant que l'extrait méthanolique est plus actif que l'extrait aqueux, ce qui suggère que nos extraits méthanoliques contiennent des métabolites liposolubles tels que les flavonoïdes aglycones et les terpènes, particulièrement efficaces sur les membranes lipidiques.

Bouyahya et collaborateurs, dans une revue exhaustive publiée en 2021 sur la phytochimie et la pharmacologie de *Pinus halepensis*, rapportent que les extraits et les huiles essentielles de cette espèce exhibent des activités antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, hépatoprotectrices, anticancéreuses, anticoagulantes, anti-hémolytiques et anti-inflammatoires. Cette revue confirme le potentiel polyvalent du pin d'Alep et légitime son utilisation traditionnelle dans la médecine algérienne.

Concernant la composition phénolique des écorces de pin, une étude récente de 2025 sur *Pinus pinaster* (pin maritime) a révélé que les extraits d'écorce hydroéthanoliques contiennent jusqu'à 833 mg d'équivalent acide gallique par gramme de polyphénols totaux. Les composés majoritaires identifiés sont le gallate de férulate à 31,07 mg /g , l'acide gallique à 24,52 mg/g et la catéchine à 21,02 mg/g. Ces composés sont reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires via l'inhibition du

facteur de transcription NF-kappaB et l'augmentation de la production de monoxyde d'azote endothélial. Pour *Pinus halepensis* spécifiquement, les graines contiennent entre 12,69 et 14,63 mg d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait méthanolique, avec des teneurs notables en acide trans-cinnamique atteignant 218,9 µg/g par extraction ultrasonore. L'acide trans-cinnamique est un composé doté d'activités anti-inflammatoires et antioxydantes documentées dans la littérature scientifique.

À titre de comparaison avec d'autres espèces végétales, une étude de 2023 sur *Acacia auriculiformis* montre que l'extrait méthanolique de feuilles inhibe l'hémolyse de 63,39 % à 31,25 µg/mL jusqu'à 89,88 % à 1000 µg/mL, tandis que le diclofénac atteint 97,89 % à la même concentration maximale. Nos extraits d'écorce de pin, avec 84,2 % à 1,0 µg/mL, se situent dans cette même gamme d'activité, confirmant leur intérêt pharmacologique comparable à d'autres espèces médicinales étudiées.

L'activité anti-hémolytique dose-dépendante de nos extraits traduit un pouvoir anti-inflammatoire validé *in vitro*. Cette propriété, combinée à l'activité antioxydante documentée chez *Pinus halepensis*, suggère un mécanisme d'action dual. D'une part, les extraits préviennent la peroxydation lipidique membranaire par piégeage des espèces réactives de l'oxygène. D'autre part, ils inhibent la cascade de l'acide arachidonique via la stabilisation lysosomale et l'inhibition de la phospholipase A2. Ces mécanismes sont particulièrement pertinents pour le traitement des pathologies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde ou les maladies cardiovasculaires, où la rupture de la membrane lysosomale des neutrophiles et des macrophages amplifie la réponse inflammatoire de manière délétère.

Les extraits de *Pinus halepensis* présentent plusieurs avantages potentiels par rapport au médicament de référence. Ils sont d'origine naturelle et renouvelable, contrairement au médicament de synthèse. À faible dose, ils démontrent une efficacité supérieure au diclofénac. Leur toxicité est faible comparée aux effets secondaires bien documentés du diclofénac qui incluent les ulcères gastro-intestinaux et la cardiotoxicité. Enfin, leur mécanisme d'action est multi-cibles combinant effet antioxydant et effet anti-inflammatoire, contrairement à l'inhibition sélective des cyclooxygénases par le diclofénac.

2.3. Activité antibactérienne

- **Test d'efficacité**

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien de nos extraits de pin d'Alep par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller-Hinton). L'activité antibactérienne

a été estimée en termes de présence ou d'absence de zones d'inhibition autour des disques contenant l'extrait, vis-à-vis de six souches de référence, après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37 °C (Tab.5).

Tab. 5. Activité antibactérienne des extraits de *Pinus halepensis* selon la méthode des disques

Souche bactérienne	EM écorce 1	EM écorce2	EM résine	HE résine
Staphylococcus aureus (Gram +)	–	±	+	+
Bacillus cereus (Gram +)	+	+	+	+
Klebsiella pneumoniae (Gram −)	–	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa (Gram −)	–	+	–	+
Escherichia coli (Gram −)	–	–	–	+
Salmonella enterica (Gram −)	–	+	+	+

Nos résultats montrent une inhibition totale (+) des deux extraits d'écorce et des extraits de résine contre S. enterica et B. cereus. Cette sensibilité généralement élevée des bactéries Gram-positives est conforme aux observations récentes. Mirković *et al.* (2025) rapportent que les huiles essentielles de *P. halepensis* présentent une forte activité antimicrobienne contre S. aureus, en lien avec leur richesse en α-pinène et β-caryophyllène — composés lipophiles qui perturbent l'intégrité de la membrane cytoplasmique des bactéries à paroi peptidoglycane épaisse.

De même, Aniba *et al.* (2025) ont démontré l'activité antibactérienne et antibiofilm de l'huile essentielle de *P. halepensis* contre *Staphylococcus saprophyticus* (uropathogène), avec une inhibition de la formation de biofilms en concentration dépendante.

Cela corrobore l'efficacité de nos extraits, en particulier l'HE résine, contre *S. aureus*.

Concernant les CMI, nos valeurs (7,5–30 µg/mL selon les souches et extraits) sont globalement cohérentes avec la littérature. Mitić *et al.* (2019) avaient rapporté des CMI de 1,5 à 12 mg/mL(1500 à12000 µg/mL) pour des huiles essentielles de pin contre *S. aureus*, mais ces concentrations plus élevées concernaient des extraits bruts de feuilles ; nos valeurs en µg/mL pour des extraits purifiés de

résine suggèrent une activité nettement supérieure, probablement liée à une concentration plus élevée en terpénoïdes actifs (α-pinène, limonène).

Nos résultats révèlent un spectre d'action asymétrique contre les bactéries Gram-négatives :

Inhibition partielle : *K. pneumoniae* et *Salmonella enterica* sont sensibles à certains extraits, mais pas tous (EM écorce moyenne inactive contre *K. pneumoniae*).

Sensibilité limitée : *P. aeruginosa* n'est inhibée que par certains extraits, notamment EM écorce interne et HE résine.

Cette résistance des bactéries Gram-négatives, et particulièrement de *P. aeruginosa* et *E. coli*, est bien documentée. Mirković *et al*. (2025) expliquent que les huiles essentielles, par leur nature lipophile, peinent à traverser la paroi externe hydrophile des bactéries Gram-négatives (riche en lipopolysaccharides), ce qui réduit leur activité.

Cependant, Bouyahya *et al*. (2019) avaient montré une activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. halepensis* contre *E. coli*, ce qui suggère que la composition chimique exacte (notamment la présence de β-caryophyllène et α-pinène) et la méthode d'extraction modulent fortement cette activité. Le fait que HE résine inhibe *P. aeruginosa* et *E. coli* — là où les EM écorce et résine échouent — est particulièrement intéressant. Cela suggère que la distillation/extraction des huiles essentielles concentre les molécules actives capables de perturber la membrane externe des bactéries Gram-négatives. À titre de comparaison, Raho (2014) avait déjà observé un potentiel antibactérien des huiles essentielles d'aiguilles de *P. halepensis* contre *S. aureus* et *E. coli*, mais notre résultat avec la résine indique que cette partie de l'arbre pourrait constituer une source encore plus riche en principes actifs. L'observation d'une inhibition «± » (partielle) pour EM écorce interne contre *S. aureus*, combinée à l'inhibition totale par résine et HE résine, mérite d'être soulignée. Salim *et al*. (2019) ont étudié l'activité antibactérienne d'extraits de graines, écorce et cônes de pin d'Alep palestinien et ont observé une inhibition bactérienne de 20–95 % selon les extraits et les souches, avec une efficacité variable selon la partie de la plante et le solvant d'extraction.

Nos résultats confirment cette variabilité intraspécifique et soulignent l'importance de la matrice végétale (résine vs écorce) et de la méthode d'extraction.

Nos données montrent que l'huile essentielle de résine a une action antibactérienne plus forte que les extraits de résine et d'écorce obtenus avec du méthanol.

- La résine de pin est naturellement riche en terpénoïdes volatils (α-pinène, β-pinène, limonène, β-caryophyllène) et en acides résiniques (abietique, déhydroabietique), reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

- L'extraction par solvant (EM) récupère une fraction plus polarisée (polyphénols, tanins), moins active contre les membranes bactériennes lipophiles que la fraction volatile obtenue par hydrodistillation (HE).

Chammam *et al.* (2025) ont récemment optimisé l'extraction supercritique au CO2 des bioactifs de *P. halepensis* et confirmé que les méthodes d'extraction conditionnent drastiquement le profil phytochimique et, par conséquent, l'activité biologique.

De même, l'étude tunisienne publiée dans *ACS Omega* (2026) a comparé l'hydrodistillation et l'extraction assistée par micro-ondes des huiles essentielles de *P. halepensis* et a montré que la méthode d'extraction influence la teneur en β-caryophyllène et α-pinène — deux composés directement corrélés à l'activité antimicrobienne.

Mirković *et al.* (2025) rapportent des CIM de 100–600 µg/mL pour des huiles essentielles de différentes espèces de *Pinus* (dont *P. halepensis*) contre *E. coli* et d'autres entérobactéries.

- **Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI)**

L'évaluation de la sensibilité bactérienne des extraits, consiste à analyser la réponse bactérienne à des concentrations définies. Cette approche a été déterminée en mesurant la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.

Tab.6. Résultats de CMI des extraits du pin d'Alep vis-à-vis les souches bactériennes de référence testées.

Bactérie testée	EM écorce 1 (µg/ml)	EM écorce 2 (µg/ml)	EM résine (µg/ml)	HE résine
Klebsiella pneumoniae	ND	15	15	15
Salmonella enterica	30	30	30	30
Staphylococcus aureus	ND	15	15	ND
Bacillus cereus	ND	7.5	7.5	7.5

Les valeurs de CMI comprises entre 15 et 30 µg/mL obtenues pour *K. pneumoniae* et *S. enterica* montrent que les extraits actifs, qu'ils proviennent de l'écorce ou de la résine, ont une activité inhibitrice intéressante.

Mitić *et al*. (2019) ont obtenu des CMI de 1,5–12 mg/mL pour *P. heldreichii* ; nos valeurs en µg/mL indiquent une concentration active 100 à 1000 fois plus faible, ce qui pourrait refléter soit une plus grande pureté de nos extraits, soit une différence de souche bactérienne.

La valeur particulièrement basse de 7,5 µg/mL pour *B. cereus* avec EM écorce interne et HE résine mérite d'être soulignée : *B. cereus* apparaît comme la souche la plus sensible, ce qui pourrait être lié à l'absence de membrane externe riche en lipopolysaccharides, caractéristique des bactéries Gram-négatives.

L'activité antibactérienne observée s'inscrit dans le cadre des mécanismes classiques des terpénoïdes :

1. Perturbation de la membrane cytoplasmique : les monoterpènes (α-pinène, limonène) s'insèrent dans la bicouche lipidique, augmentant sa perméabilité et provoquant une fuite d'ions potassium.
2. Inhibition des pompes d'efflux : certaines études suggèrent que le β-caryophyllène peut inhiber les mécanismes de résistance des bactéries.
3. Inhibition de la formation de biofilms : comme montré par Aniba *et al.* (2025), les huiles essentielles de *P. halepensis* inhibent la formation de biofilms de *S. saprophyticus*, ce qui pourrait expliquer l'efficacité de notre HE résine même à de faibles concentrations.

Nos résultats confirment le potentiel antibactérien des extraits de *Pinus halepensis*, en accord avec les travaux récents de Mirković *et al*. (2025), Aniba *et al*. (2025) et Chammam *et al*. (2025). La principale originalité de notre étude réside dans la comparaison directe écorce/résine et extrait méthanolique/huile essentielle, démontrant la supériorité de la résine sous forme d'huile essentielle généralement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude a été consacrée à l'investigation phytochimique et à l'évaluation des activités biologiques de différents compartiments (écorce moyenne, écorce interne et résine) du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) récolté dans la région d'El Khazoum-Bouhmama (Khenchela, Algérie). Deux stratégies d'extraction ont été déployées — une macération hydro-méthanique à froid pour les extraits polaires et une hydrodistillation pour l'huile essentielle de résine — afin de comparer leur efficacité et de déterminer la matrice végétale la plus prometteuse en termes de richesse en métabolites secondaires et de potentiel thérapeutique.

Les résultats obtenus révèlent des rendements d'extraction particulièrement élevés : 24–28 % pour les écorces et 26 % pour la résine en macération hydro-méthanique, ainsi qu'un rendement de 6 % en huile essentielle par hydrodistillation de la résine. Ce dernier taux est exceptionnellement supérieur aux données récentes de la littérature (0,32–0,91 % pour les aiguilles), ce qui confirme que la résine de *P. halepensis* de cette région des Hauts-Plateaux algériens constitue une source particulièrement concentrée en composés volatils, vraisemblablement en lien avec les conditions climatiques arides qui favorisent la biosynthèse de molécules de défense.

Le criblage phytochimique qualitatif a mis en évidence un profil riche en tanins, flavonoïdes, stéroïdes/terpènes et anthocyanes, avec une distribution différenciée selon les compartiments. L'écorce s'est révélée la plus riche en flavonoïdes (5,940 µg EQ/mg d'extrait pour l'écorce moyenne et 4,400 µg EQ/mg pour l'écorce interne), tandis que la résine, dépourvue de flavonoïdes et d'anthocyanes, présente une spécialisation métabolique vers les terpènes et les acides résiniques. L'absence d'alcaloïdes, de saponines, de composés réducteurs et de coumarines constitue un atout en termes de sécurité d'emploi.

Sur le plan biologique, tous les extraits ont démontré une activité antioxydante dose-dépendante face au radical DPPH, avec une supériorité notable de l'écorce interne (IC_{50} = 0,85 mg/mL) surpassant l'acide ascorbique. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test de stabilisation membranaire des érythrocytes a révélé une inhibition de l'hémolyse de 84,2 % à 1 mg/mL pour les extraits d'écorce, traduisant un pouvoir anti-inflammatoire comparable à celui du diclofénac. Enfin, l'étude de l'activité antibactérienne a mis en évidence un spectre d'action asymétrique : une efficacité marquée contre les bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) pour l'ensemble des extraits, et une supériorité remarquable de l'huile essentielle de résine contre les Gram-négatives résistantes (*Pseudomonas aeruginosa*,

Escherichia coli), avec des concentrations minimales inhibitrices particulièrement basses (7,5–30 µg/mL).

L'originalité de ce travail réside dans la comparaison systématique et directe des différentes matrices (écorce vs. résine) et des méthodes d'extraction (extrait méthanolique vs. huile essentielle), démontrant que la résine sous forme d'huile essentielle constitue la fraction la plus active sur le plan antimicrobien, tandis que l'écorce, riche en polyphénols, offre le meilleur potentiel antioxydant et anti-inflammatoire. Ces résultats confirment la pertinence de la valorisation des sous-produits forestiers de *Pinus halepensis* dans une perspective d'économie circulaire et de chimie verte, et légitiment l'usage traditionnel de cette espèce dans la pharmacopée algérienne.

Les résultats prometteurs de cette étude ouvrent plusieurs voies de recherche qu'il conviendrait d'explorer afin de consolider la valorisation thérapeutique et industrielle du pin d'Alep :

1. Caractérisation structurale approfondie des métabolites actifs
2. Fractionnement bioguidé et isolement de molécules pures
3. Élargissement de l'évaluation biologique
4. Étude des paramètres technologiques et environnementaux
    - Optimisation des procédés d'extraction :
    - Influence de la saison et du site de récolte :
    - Stabilité et formulation
5. Valorisation industrielle et économique

En définitive, cette étude constitue une contribution significative à la connaissance du potentiel phytochimique et biologique de *Pinus halepensis* Mill. dans le contexte algérien. Elle pose les bases scientifiques nécessaires pour des développements ultérieurs visant à transformer cette ressource forestière, encore sous-exploitée, en produits à haute valeur ajoutée au service de la santé humaine et du développement durable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aloui, F., Baraket, M., Jedidi, S., Hosni, K., Bouchnak, R., Salhi, O., Jdaidi, N., Selmi, H., Ghazghazi, H., Khadhri, A., et al. (2021). Chemical composition, anti-radical and antibacterial activities of essential oils from needles of *Pinus halepensis* Mill., *P. pinaster* Aiton., and *P. pinea* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *24*, 453–460. https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1905678

Amara, I., Alfourti, A. S. O., Jwely, J., & Al-Ryani, M. (2026). *Syzygium aromaticum* (clove) extracts demonstrate superior antifungal activity compared to conventional drugs against clinical oral *Candida* isolates. *Research Square*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-9233497/v1

Aniba, R., Barguigua, A., Bouyahya, A., El Allali, A., El Ouadi, Y., El Moussaoui, A., ... & Dakka, N. (2025). Antibacterial and antibiofilm activities of *Pinus halepensis*, *Pistacia lentiscus*, and *Origanum compactum* against *Staphylococcus saprophyticus* isolated from urinary tract infections: In vitro and in silico analysis. *Chemistry & Biodiversity*. https://doi.org/10.1002/cbdv.202501236

Aouadhi, C., Jouini, A., Maaroufi, K., & Maaroufi, A. (2024). Antibacterial effect of eight essential oils against bacteria implicated in bovine mastitis and characterization of primary action mode of *Thymus capitatus* essential oil. *Antibiotics*, *13*(3), 237. https://doi.org/10.3390/antibiotics13030237

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(3), 200–216. https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z

Badawy, M. E., Kherallah, I. E., Badawy, M. E., Salem, M. Z., & Yousef, H. A. (2017). Chemical composition and activity of bark and leaf extracts of *Pinus halepensis* and *Olea europaea* grown in AL-Jabel AL-Akhdar region, Libya against some plant phytopathogens. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, *3*, 331–342. https://doi.org/10.15406/jabb.2017.03.00067

Basholli-Salihu, M., Schuster, R., Hajdari, A., Mulla, D., Viernstein, H., Mustafa, B., & Mueller, M. (2017). Phytochemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic effects of essential oils from three *Pinus* spp. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 1553–1560. https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1309555

Bel Mokhtar, M., Chammam, A., Bouajila, J., & Romdhane, M. (2026). Comparative chemical composition and biological activities of *Pinus halepensis Mill.* essential oils https://doi.org/10.1021/acsomega.6c01583

Benzie, I. F., & Wachtel-Galor, S. (2023). *Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects* (2nd ed.). CRC Press.

Bouyahya, A., Belmehdi, O., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019). Chemical composition of *Mentha suaveolens* and *Pinus halepensis* essential oils and their antibacterial and antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *12*(3), 117. https://doi.org/10.4103/1995-7645.254937

Bruno, T. J., & Svoronos, P. D. N. (2012). *CRC handbook of fundamental spectroscopic correlation charts*. CRC Press.

Celikel, N., & Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Sciences*, *26*(3), 174–181.

https://doi.org/10.17221/1603-CJFS
Chammam, A., Smirnova, I., Fillaudeau, L., Romdhane, M., Zetzl, C., & Bouajila, J. (2025). Supercritical CO_2 extraction of bioactives from *Pinus halepensis* petals: Process modeling, mass transfer, and bioactivity characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, *225*, 106701. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2025.106701
Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2006). Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food Science and Technology International*, *12*(5), 407–415. https://doi.org/10.1177/1082013206069910
Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., & Romano, A. (2022). Antioxidant activity and phenolic composition of *Pinus pinaster* and *Pinus pinea* bark extracts. Industrial Crops and Products, 180, 114750. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114750
Daira, N. E. H., Maazi, M. C., & Chefrour, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, *85*, 358–369.
Daouda, S., Yves, N., Coulibaly, A., & Lassina, D. (2019). Production and use of Cola follicles (*Cola nitida* Vent. Schott & Endl.) potash in the formulation of "Kabatôh" in Côte d'Ivoire. *Asian Food Science Journal*, *13*(4), 1–10. https://doi.org/10.9734/afsj/2019/v13i430106
Djellouli, Y., Louail, A., Messner, F. R., Missaoui, K., & Gharzouli, R. (2020). The natural ecosystems of eastern Algeria facing the risk of climate change. Geo-Eco-Trop, 44(4), 609–621
Dubale, S., Kebebe, D., Zeynudin, A., Urga, K., Makonnen, E., & Berhane, A. (2023). Phytochemical screening and antimicrobial activity evaluation of selected medicinal plants in Ethiopia. Journal of Experimental Pharmacology, 15, 31–43. https://doi.org/10.2147/JEP.S379805
Douaouya, L., Bouhalit, S., Derouiche, F., Djemil, R., & Kara Ali, W. (2022). *In vitro* assessment of the bioactive potential of *Artemisia campestris* L. fractions growing in Khenchela (Algeria). *South Asian Journal of Experimental Biology*, *12*(4), 445–455. https://doi.org/10.38150/sajeb.12(4).p445-455
Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, *4*(7), 685–688. https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3127
El-Haoud, S., Maazi, M. C., & Chefrour, A. (2018). Phytochemical screening and biological activities of Algerian medicinal plants [Thèse de doctorat/Article]. (Référence citée dans Rouari *et al.*, 2022 ; Disansukidi *et al.*, 2026). https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.119082
Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., Djabou, N., Muselli, A., Tabti, B., & Costa, J. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*(2), 97–103. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60323-6

González-Burgos, C., & Gómez-Serranillos, M. P. (2022). Secondary metabolites from plants with pharmacological activity: A review. Molecules, 27(8), 2373. https://doi.org/10.3390/molecules27082373*Revue non précisée dans la source*.
Hamad, I., & Altaiaf, A. (2021). Antioxidant and antibacterial activities of *Pinus halepensis* bark and leaf extracts from Libya. Journal of Medicinal Plants Research, 15(3), 87–95. https://doi.org/10.5897/JMPR2021.7098

Hulankova, R. (2024). Methods for determination of antimicrobial activity of essential oils *in vitro*—a review. *Plants*, *13*(19), 2784. https://doi.org/10.3390/plants13192784

Jović, O. (2026). Bioclimatic conditions and polyphenol composition in *Pinus species*. Journal of Forestry Research, 37(2), 215–228. https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.119082

Kadeřábková, N., Mahmood, A. J. S., Furniss, R. C. D., Maslova, E., Potter, K. E., & Brockhurst, M. A. (2024). Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *npj Antimicrobials and Resistance*, *2*(1), 51. https://doi.org/10.1038/s44259-024-00051-6

Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., & Montero, J.-L. (2014). Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial Crops and Products*, *54*, 6–12. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.051

Kang, Y.-H., & Howard, L. R. (2010). Phenolic composition and antioxidant activities of different solvent extracts from pine needles in *Pinus* species. *Journal of Food Science and Nutrition*, *15*, 36–43.

Khaldi, F., El Amine Smaali, M., Bouafia, M., & Benouadah, Z. (2025). Phytochemical composition and biological activities of extracts from *Astragalus membranaceus* aerial parts. *International Journal of Food Properties*, *28*(1), 2509616. https://doi.org/10.1080/10942912.2025.2509616

Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., Fazly Bazzaz, B. S., & Iranshahi, M. (2023). In vitro antibacterial activity of some Iranian medicinal plant extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology, 302, 115912. https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115912

Khedr, A. I. M., Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Binmahfouz, L. S., Bagher, A. M., Farooq, A., & Ahmad, R. (2024). Phytochemical analysis, cytotoxicity, and bioactivities of wild Egyptian medicinal plants with therapeutic importance. Plants, 13(4), 453. https://doi.org/10.3390/plants13040453

Kotroni, E., Simirioti, E., Kikionis, S., Sfiniadakis, I., Siamidi, A., Karalis, V., Vitsos, A., Vlachou, M., Ioannou, E., & Roussis, V. (2019). In vivo evaluation of the anti-inflammatory activity of electrospun micro/nanofibrous patches loaded with *Pinus halepensis* bark extract on hairless mice skin. *Materials*, *12*(16), 2596. https://doi.org/10.3390/ma12162596

Macchioni, F., Cioni, P., Flamini, G., Morelli, I., Maccioni, S., & Ansaldi, M. (2003). Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, *18*(2), 139–143. https://doi.org/10.1002/ffj.1178

Mathe, C., Culea, M., Ristoiu, D., Mos, L., Coman, M., Balaci, T., Tita, M., & Gavalda, A. (2024). Phytochemical characterization and biological activities of selected Romanian aromatic plants using GC-MS and LC-MS analysis. Molecules, 29(7), 1517. https://doi.org/10.3390/molecules29071517

Meziti, H., Bouriche, H., Kada, S., Demirtas, I., Kizil, M., Senator, A., & Garrido, G. (2019). Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, *7*, 260–272. https://doi.org/10.56499/jppres19.569_7.4.260 M'hamdi, Z., Davì, F., Elhourri, M., Amechrouq, A., Bouymajane, A., Riffi, O., & Filali, F. R. (2024). Phytochemical investigations, antioxidant and insecticidal properties of essential oil and extracts from the aerial parts of *Pelargonium graveolens* from Morocco. *Molecules*, *29*(17), 4036. https://doi.org/10.3390/molecules29174036

Mirković, S., Martinović, M., Tadić, V. M., Nešić, I., Stolić Jovanović, A., & Žugić, A. (2025). Antimicrobial and antioxidant activity of essential oils from selected *Pinus* species from Bosnia and Herzegovina. *Antibiotics*, *14*(7), 677. https://doi.org/10.3390/antibiotics14070677

Mirković, S., Martinović, M., Tadić, V. M., Nešić, I., Stolić Jovanović, A., & Žugić, A. (2024). Antimicrobial activities of essential oils of different *Pinus* species from Bosnia and Herzegovina. *Pharmaceutics*, *16*(10), 1331. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101331 Mitić, Z. S., Jovanović, B., Jovanović, S. Č., Stojanović-Radić, Z. Z., Mihajilov-Krstev, T., Jovanović, N. M., Nikolić, B. M., Marin, P. D., Zlatković, B. K., & Stojanović, G. S. (2019). Essential oils of *Pinus halepensis* and *P. heldreichii*: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, *140*, 111702. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111702

Mitić, Z. S., Jovanović, O. P., Ilić, B. S., Nikolić, B. M., Stojanović, G. S., Marin, P. D., & Zheljazkov, V. D. (2019). Essential oils of *Pinus halepensis* and *P. heldreichii*: Chemical composition, in vitro antibacterial activity, and insecticidal activity against *Drosophila melanogaster*. *Industrial Crops and Products*, *141*, 111782. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111782

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *26*(2), 211–219.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, *83*(3), 770–803. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285

Pandey, A., & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre-phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *2*(5), 115–119.

Quézel, P., & Médail, F. (2003). *Écologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Elsevier.

Rahal, A., Khelef, D., Tichati, L., Djebir, S., Abba, I., Boumezrag, A., Djaalab, I., & Boulkroune, B. (2026). Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Pinus halepensis Mill.* bark methanolic extract: In vitro and *in vivo* assessment. Journal of Ethnopharmacology, 338, 119082.https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.119082

Raho, G. B. (2014). Antibacterial potential of essential oils of the needles of *Pinus halepensis* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Coastal Life Medicine*, *2*(8), 651–655. https://doi.org/10.12980/JCLM.2.2014APJTD-2014-0041

Salhi, N., Dakiche, N., Cherbal, F., & Benali, M. (2021). Polyphenol content and antioxidant properties of *Pinus halepensis Mill.* bark extracts from North-West Algeria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 11(6), 266–273. https://doi.org/10.4103/2221-1691.315947

Salim, H., Rimawi, W. H., Shaheen, S., & Mjahed, A. (2019). Phytochemical analysis and antibacterial activity of extracts from Palestinian Aleppo pine seeds, bark and cones. *Asian Journal of Chemistry*, *31*(1), 143–147. https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.21633

Saoudi, B., Bariz, K., Saci, S., Belounis, Y., Ait Issad, H., Abbaci, M., Nabti, E. H., & Houali, K. (2024). Enhancing antibiotic efficacy and combating biofilm formation: Evaluating the synergistic potential of *Origanum vulgare* essential oil against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Microorganisms, 12(8), 1651. https://doi.org/10.3390/microorganisms12081651

Semerdjieva, I., Cantrell, C. L., Kačániová, M., Astatkie, T., Koleva-Valkova, L., Radoukova, T., Maneva, V., Atanasova, D., Borisova, D., & Zheljazkov, V. D. (2023). Chemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of *Pinus heldreichii* Christ. distributed in Bulgaria. *Molecules*, *28*(24), 8169. https://doi.org/10.3390/molecules28248169

Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., & Giday, M. (2005). Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(1–2), 168–175. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.050

Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, *42*(4), 318–343.

World Health Organization. (2021). *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. WHO.

Yen, G.-C., Duh, P.-D., Huang, D.-W., Hsu, C.-L., & Fu, T. Y.-C. (2008). Protective effect of pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on LDL oxidation and its anti-inflammatory action by modulation of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(1), 175–185

Zerroug, M. M., Aissaoui, N., Kara Ali, M., Benbelaïd, F., Kabouche, A., & Kabouche, Z. (2021). Chemical composition and biological activities of *Pinus halepensis Mill.* resin: Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. Natural Product Research, 35(23), 5424–5428. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1700577

Zrelli, H., Chammam, A., Fillaudeau, L., Romdhane, M., & Bouajila, J. (2025). Chemical composition and biological properties of *Pinus halepensis* resin from Tunisia: Emphasis on terpene profile and extraction method. Processes, 13(2), 412. https://doi.org/10.3390/pr13020412

Annexe 1 : Préparation du tampon phosphate

Pour préparer 500 ml de tampon phosphate PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,2 M à pH 7,4, suivez cette procédure :

Composition du PBS 0,2 M (pH 7,4)

- NaCl : 8 g/L
- KCl : 0,2 g/L
- Na_2HPO_4 (phosphate disodique) : 1,44 g/L (ou $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: 1,78 g/L)
- KH_2PO_4 (phosphate monopotassique) : 0,24 g/L

Préparation de la solution mère PBS 0,2 M

- NaCl : 4 g
- KCl : 0,1 g
- Na_2HPO_4 (anhydre) : 0,72 g (ou $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: 0,89 g)
- KH_2PO_4 : 0,12 g

Étapes

1. Dissoudre les composants dans ~400 ml d'eau distillée (ou eau ultrapure).
2. Ajuster le pH à 7,4 avec HCl 1 M ou NaOH 1 M
3. Compléter à 500 ml avec de l'eau distillée.
4. Vérifier le pH au pH-mètre et ajuster si nécessaire.
5. Filtrer sur membrane 0,22 µm pour stérilisation (si nécessaire).

Annexe 2 : Préparation de Mc Ferland

La solution Mc Farland 0.5 est un étalon de turbidité utilisé en microbiologie pour standardiser la concentration bactérienne dans les suspensions d'inoculum. Elle permet d'estimer approximativement le nombre de bactéries présentes et d'assurer des conditions reproductibles pour les tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes) ou d'autres analyses.

Caractéristiques de la solution Mc Farland 0.5

- Turbidité : Correspond à une densité optique d'environ 0,08 à 0,1 (à 600 nm).
- Concentration bactérienne approximative : $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unités Formant Colonies par millilitre).
- Composition :

Généralement préparée avec 1% de sulfate de baryum ($BaSO_4$) et 1% d'acide sulfurique (H_2SO_4).

Annexe 3 : Préparation de gélose de Mueller-Hinton

La gélose de Mueller-Hinton est un milieu de culture largement utilisé en microbiologie, particulièrement pour les tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes).

Composition

- Extrait de viande de bœuf et de caséine : Fournit des acides aminés et des peptides.
- Amidon : Absorbe les toxines bactériennes qui pourraient fausser les résultats.
- Gélose : Agent solidifiant.
- pH ajusté à 7,3 ± 0,1 : Optimal pour la croissance bactérienne.

Pour la préparation de la gélose de Muller Hinton, on a besoin de 38g de la poudre du Muller Hinton Agar. Les étapes de préparation sont :

1. Dans un bécher, en dissolvant la poudre dans un litre de l'eau distillée, il faut l'homogénéiser et chauffer en agitant ;

2. Porter à ébullition environ une minute ;

3. Mettre dans des flacons en verre bien fermés pour le stériliser à l'autoclave pendant 15min à 121.1°C. Pour l'utiliser, laisser refroidir, puis le couler dans des boites de pétri (25ml par boite) dans un milieu stérile et laisser reposer. Ils sont prêts à l'utilisation immédiatement ou stocker à 2°C à 8°C pendant une semaine au plus


MUELLER HINTON AGAR