

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Biologie Physico-Chimique
Laboratoire ou unité de recherche de rattachement Biochimie Appliquée

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présentée par
ATIA Amina

Thème

**Activités cicatrisante et anti-inflammatoire d'une formulation préparée
à base de bourgeons du Peuplier noir (*Populus nigra*)**

Soutenue le : 24 avril 2024

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme BEDJOU Fatiha

Professeur

Univ. de Béjaïa

Présidente

Mme ATMANI Dina

Professeur

Univ. de Béjaïa

Rapporteur

Mme AYOUNI Karima

MCB

Univ. de Béjaïa

Co-rapporteur

Mme KHAMTACHE Sabiha

MCA

Univ. de Béjaïa

Examinatrice

Mr HABA Hamada

Professeur

Univ. de Batna 1

Examinateur

Année Universitaire : 2024-2025

AVANT-PROPOS

Je crois fort que Dieu nous envoie les personnes dont nous avons le plus besoin au bon moment, et non celles que nous désirons. Quoi qu'il en soit, je tiens à exprimer ma gratitude à toutes celles et ceux qui ont croisé mon chemin, qu'ils aient été bienveillants ou non. Certaines m'ont montré ce à quoi je veux ressembler dans la vie et d'autres ce à quoi je ne veux absolument pas ressembler.

REMERCIEMENTS

Louange à Allah par la grâce Duquel les choses pures aboutissent.

Ce travail fut réalisé au sein du laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Béjaia, sous la direction de Madame le Professeur ATMANI-KILANI Dina. Je la remercie de m'avoir confié ce sujet, d'avoir été présente et patiente avec moi, et de m'avoir soutenu et orienté. Je tiens à vous exprimer ma sincère et profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également à ma co-directrice de thèse, Madame AYOUNI Karima, qui, malgré ses nombreuses fonctions au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, est restée disponible tout au long de ce travail de thèse. Je la remercie pour ses encouragements et ses précieux conseils.

Je remercie Mme BEDJOU Fatiha, professeur à l'université A. Mira de Béjaia, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance de thèse.

Je remercie également Mme KHAMTACHE Sabiha, maître de conférences A à l'université A. Mira de Béjaia, et M. HABA Hamada, professeur à l'université de Batna 1, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

À tous les membres du Laboratoire de Biochimie Appliquée, en particulier : Mme Yous Farah, Melle Belkhir Sarra, Mme Kasmi Souad, Melle Moulaoui Kenza, Melle Benloukil Malika, Mme Ouarabah Asma, Mme Bouguelid Ghania, Melle Saidene Naima, Melle Kaddour Taoues, Melle Karou Lydia, Melle Hanifi Lamia, Melle Kadi Radia, Mr Aissat Aghiles, Mr Zaidi Sid Ali, Mr Benramdane Elias, Dris Nabil, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre présence, votre aide et votre soutien moral.

Je voudrais remercier également tous les enseignants du laboratoire de Génétique, à savoir M. Atmani Djebbar, Mme Chaher Nassima, Mme Rahmani Meriem, Mme Debbache Nadjet, Mme Cheraft Nassima, Mme Medjahed Zeineb.

Je tiens à remercier tous les enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour leur précieuse contribution tout au long de mon parcours au sein de cette institution.

Je voudrais exprimer ma gratitude à mes amies, qui se comptent sur les doigts d'une main. Je suis immensément reconnaissante de vous avoir dans ma vie.

Enfin, je voudrais exprimer ma profonde gratitude à ma famille pour leur présence, leur amour, leurs encouragements, leur confiance, leur patience et leurs conseils avisés, vous avez cru en moi, ce qui m'a permis de rester motivé et de ne jamais perdre de vue l'importance de la famille. Merci à chacun de vous pour m'avoir permis d'arriver jusque-là, avec la certitude que, quelle que soit la difficulté du chemin, je pouvais toujours compter sur votre soutien.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur la peau.....	4
I.1.1. Définition de la peau.....	4
I.1.2. Anatomie de la peau.....	4
I.1.2.1. Epiderme	5
I.1.2.2. Jonction dermo-épidermique.....	6
I.1.2.3. Derme.....	6
I.1.2.4. Hypoderme	10
I.1.2.5. Annexes cutanées	10
I.1.2.6. Innervation cutanée.....	10
I.1.2.7. Vascularisation de la peau.....	11
I.1.3. Fonction de la peau.....	11
I.2. PLAIE ET CICATRISATION.....	12
I.2.1. Classification des plaies	12
I.2.2. Définition de la cicatrisation.....	13
I.2.3. Phases de la cicatrisation	13
I.2.4. Facteurs influençant la cicatrisation	20
I.2.5. Traitements conventionnels	21
I.3. PHYTOTHERAPIE ET <i>POPULUS NIGRA</i>	23
I.3.1. Plantes médicinales.....	23
I.3.2. <i>Populus nigra</i>	24
I.3.2.1. Description botanique de <i>Populus nigra</i>	24
I.3.2.2 Classification taxonomique de <i>Populus nigra</i>	25
I.3.2.3 Répartition géographique de <i>Populus nigra</i>	26
I.3.2.4. Usage traditionnel de <i>Populus nigra</i>	26
I.3.2.5. Les composés phénoliques	27
I.3.2.6. Composition phytochimique de <i>Populus nigra</i>	30

I.4. PLANTES MEDICINALES ET FORMULATIONS PHARMACOLOGIQUES.....	34
I.4.1. Formes galéniques des médicaments à base de plantes	35
I.4.1.1. Les formes solides.....	35
I.4.1.2. Les formes liquides.....	36
I.4.1.3. Les formes utilisées en usage externe	36

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal « <i>Populus nigra</i> ».....	38
II.1.1. Récolte	38
II.1.2. Extraction des composés phénoliques.....	38
II.2. Animaux d'expérimentation et conditions d'élevage.....	38
II.3. Produits chimiques	39
II.4. Détermination de la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tanins	39
II.4.1. Dosage des phénols totaux.....	40
II.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	40
II.4.3. Dosage des tanins condensés	41
II.4.4. Dosage des tanins hydrolysables.....	41
II.5. Analyse HPLC-MS	42
II.6. Evaluation de l'activité cytotoxique sur les érythrocytes.....	42
II.7. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	43
II.7.1. Test du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil.....	43
II.7.2. Test de l'acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).....	43
II.7.3. Test de blanchissement de la bêta-carotène	45
II.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	46
II.8.1. Activité anti-hémolytique.....	46
II.8.2. Activité anti-monoxyle d'azote.....	46
II.8.3. Activité antitrypsine.....	47
II.8.4. Activité anti-lipoxygénase	48
II.8.5. Activité anti-cyclooxygénase	48
II.9. Activité antibactérienne	49
II.10. Activité cicatrisante <i>in vivo</i>	49
II.10.1. Préparation des pommades.....	49
II.10.2. Modèle de cicatrisation par excision.....	50
II.10.3. Étude biochimique.....	51

II.10.3.1. Estimation des taux d'hydroxyproline et d'héxosamine.....	51
II.10.3.2. Estimation de l'activité de la myéloperoxydase.....	54
II.10.3.3. Estimation de l'activité des enzymes antioxydants.....	55
II.10.3.4. Estimation de la teneur en protéines	57
II.10.4. Estimation de l'activité des transaminases dans le sérum sanguin.....	57
II.10.5. Analyse histologique.....	58
II.11. Analyse statistique	59

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Extraction et détermination de la teneur en composés phénoliques des bourgeons floraux de <i>P. nigra</i>	60
III.1.1. Méthode et rendement d'extraction	60
III.1.2. Détermination des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins	61
III.2. Analyse LC-MS.....	64
III.3. Évaluation de l'activité cytotoxique sur les érythrocytes.....	65
III.4. Évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	66
III.4.1. Test du DPPH.....	67
III.4.2. Test de l'ABTS.....	67
III.4.3. Test de blanchissement de la β -carotène.....	67
III.5. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	69
III.5.1. Activité anti-hémolytique	69
III.5.2. Activité anti-monoxyle d'azote	70
III.5.3. Activité antitrypsine	71
III.5.4. Activité anti-lipoxygénase et anti-cyclooxygénase	72
III.6. Évaluation de l'activité antibactérienne.....	73
III.7. Évaluation de l'activité cicatrisante.....	74
III.7.1. Détermination de la contraction des plaies.....	74
III.7.1.1. Observation macroscopique des plaies.....	74
III.7.1.2. Pourcentage de contraction des plaies.....	76
III.7.2. Etude biochimique	78
III.7.2.1. Estimation des taux d'hydroxyproline et d'hexosamine	78
III.7.2.2. Estimation de l'activité de la myéloperoxydase	81

III.7.2.3. Estimation de l'activité des enzymes antioxydantes, superoxyde dismutase et catalase.....	83
III.7.3. Estimation de l'activité des transaminases dans le sérum sanguin	86
III.7.4. Analyse histologique.....	88
III.7.4.1. Analyse histologique des tissus hépatiques	88
III.7.4.2. Analyse histologique des tissus cutanés.....	89
Conclusion et perspectives	92
Références bibliographiques	94

Annexes

Résumé

LISTE DES ABREVIATIONS

- ABTS** : Acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
- ALT** : Alanine aminotransférase
- ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- AST** : Aspartate aminotransférase
- BBC** : Bleu Brillant de Coomassie
- bFGF** : *Fibroblast Growth Factor*
- BSA** : *Bovine Serum Albumin*
- C** : Carbone
- CAT** : Catalase
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- COX-2** : Cycloxygénase-2
- DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- EAC** : Equivalent en acide caféique
- EAT** : Equivalent en acide tannique
- ECA** : Equivalent en catéchine
- EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique
- EMB** : *Eosin Methylene Blue*
- EQUE** : Equivalent en quercétine
- ERK** : *Extracellular Signal-regulated Kinase*
- ERO** : Espèces réactives de l'oxygène
- ESI** : *Electrospray Ionisation*
- Fc** : Fragment cristallisable
- FGFR** : *Fibroblast growth factor receptors*
- GAG** : Glycosaminoglycane
- Gly** : Glycine
- GOT** : Glutamate oxaloacétate transaminase
- GPS** : *Global Positioning System*
- GPT** : Glutamate-pyruvate transaminase
- HPLC-MS** : *High Performance Liquid Chromatograph-mass spectrometry*
- HTAB** : *Hexyltrimethylammonium bromide*
- IC** : *Inhibitory concentration*
- IFN- γ** : Interferon gamma

IKK : *Inhibitory- κ B Kinase*

IL : Interleukines

LDH : Lactate déshydrogénase

LOX : Lipoxygénase

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Leucotriène

MEC : Matrice extracellulaire

MH : Müller-Hinton

MMP : Métalloprotéase matricielle

MPO : Myéloperoxydase

NADPH : Nicotinamide Adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B : *Nuclear Factor-kappa B*

NO : *Nitric oxide*

OMS : Organisation mondiale de santé

PBS : *Phosphate-buffered saline*

PDGF : *Platelet-derived growth factor*

PG : Protéoglycane

PGE2 : Prostaglandine E2

PGI2 : Prostaglandines I2

pH : Potentiel d'Hydrogène

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PLA2 : Phospholipase A2

SOD : Superoxyde dismutase

TGF- β 1 : *Transforming growth factor*

TMPD : *N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine*

TNBS: *Trinitrobenzenesulphonic acid*

TNF- α : *Tumor necrosis factor*

UAE : *Ultrasound Assisted Extraction*

UFC : Unité formant colonie

UPLC : *Ultra-performance liquid chromatography*

UV : Ultraviolet

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie de la peau.....	4
Figure 2 : Les différentes couches de l'épiderme et les cellules épidermiques.....	5
Figure 3 : Principaux composants de la matrice extracellulaire.....	7
Figure 4 : Structure moléculaire du collagène de type I à triple hélice et à chaîne unique.....	8
Figure 5 : Hydroxylation de la proline en hydroxyproline.....	8
Figure 6 : Organisation des protéoglycanes et glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire.....	9
Figure 7 : Phases de la cicatrisation cutanée.....	13
Figure 8 : Formation du caillot de fibrine au cours de la phase d'hémostase.....	14
Figure 9 : Voie de signalisation NF- κ B.....	16
Figure 10 : Réactions chimiques se produisant dans le phagolysosome.....	17
Figure 11 : Photographie de l'arbre de <i>Populus nigra</i>	24
Figure 12 : Bourgeons de <i>Populus nigra</i>	25
Figure 13 : Répartition géographique de <i>Populus nigra</i>	26
Figure 14 : Classification des composés phénoliques.....	29
Figure 15 : Mécanisme d'action de l'acide férulique sur l'inhibition de l'inflammation dans un modèle de colique ulcéreuse.....	31
Figure 16 : Mécanisme d'action des flavonoïdes sur la cicatrisation.....	32
Figure 17 : Mécanisme d'action de l'acide tannique sur la cicatrisation.....	33
Figure 18 : Mécanisme d'action de la curcumine sur l'inhibition de l'inflammation dans un modèle d'excision chez le rat.....	34
Figure 19 : Mécanisme de réaction du DPPH avec un antioxydant	43
Figure 20 : Mécanisme de réaction de l'ABTS \bullet^+ avec un antioxydant	44
Figure 21 : Processus de blanchissement de la β -carotène.....	45
Figure 22 : Principe du protocole de l'estimation des taux d'hydroxyproline	52
Figure 23 : Structure chimique d'un glycosaminoglycane	53
Figure 24 : Oxydation de l' <i>o</i> -dianisidine par la peroxydase en présence d'H ₂ O ₂	54
Figure 25 : Auto-oxydation du pyrogallol et son inhibition par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD)	56
Figure 26 : Evolution de la surface des plaies des différents groupes de rats aux jours 1, 7, 14, 17, et 20.....	75

Figure 27 : Pourcentage de contraction des plaies des groupes de rats aux jours 1, 7, 14, 17, et 20.....	77
Figure 28 : Taux d'hydroxyproline des tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20.....	79
Figure 29 : Taux d'hexosamine des tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20.....	80
Figure 30 : Activité de la myéloperoxydase dans les tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20.....	83
Figure 31 : Activité de la catalase des tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20.....	84
Figure 32 : Activité de la superoxyde dismutase dans les tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20.	85
Figure 33 : Activité des transaminases dans les tissus cutanés des différents groupes de rats aux jours 14 et 20.	87
Figure 34 : Coupes histologiques des tissus hépatiques colorées à l'hématoxyline-éosine aux jours 14 (a1-e1) et 20 (a2-e2) après l'excision.	89
Figure 35 : Coupes histologiques des tissus cutanés colorées à l'hématoxyline-éosine aux jours 14 (a1-e1) et 20 (a2-e2) après l'excision.....	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Tableau des scores de l'érythème, l'exsudat, l'œdème et la croûte.....	51
Tableau II : Détermination des taux de phénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés et tanins hydrolysable dans l'extrait éthanolique de <i>P. nigra</i>	61
Tableau III : Composés phénoliques identifiés dans l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de <i>P. nigra</i> par UPLC-ESI-MS/MS.....	64
Tableau IV : Activités anti-radicalaires et activité de blanchissement de la β -carotène de l'extrait de bourgeons floraux de <i>P. nigra</i> , de l'acide caféique et du trolox.....	66
Tableau V : Activités anti-hémolytique, anti-NO• et antitrypsine de l'extrait de bourgeons floraux de <i>P. nigra</i> et de l'acide caféique.....	69
Tableau VI : Activités anti-cyclooxygénase et anti-lipoxygénase de l'extrait de bourgeons floraux de <i>P. nigra</i> , de l'acide gallique et de l'indométacine.....	72

Introduction

La peau, notre plus grand organe, constitue la principale barrière de défense, protégeant nos structures corporelles internes des agressions environnementales externes et des agents pathogènes (**Graham et al., 2019**). Une rupture de cette barrière ou une perturbation de la structure et de la fonction normale de la peau est définie comme une plaie cutanée. Malgré la capacité de réparation innée considérable de la peau par le processus de cicatrisation, la gravité de la plaie ainsi que les infections retardent la cicatrisation et ralentissent la régénération des tissus endommagés (**Yadav et al., 2019**). En raison de ces complications, les plaies représentent un problème majeur de santé publique, avec un impact substantiel sur la morbidité, la mortalité et l'économie des soins de santé, soulignant le besoin urgent de stratégies de gestion efficaces (**Martinengo et al., 2019**).

Les traitements des plaies cutanées ont pour objectif principal de favoriser la cicatrisation de la peau dans les plus brefs délais, tout en minimisant la douleur et l'inconfort (**Thakur et al., 2011**). Par conséquent, plusieurs interventions thérapeutiques conventionnelles sont utilisées pour résoudre les problèmes d'inflammation, de dommages oxydatifs et d'infection (**Pattnaik et al., 2023**). Ces traitements sont souvent associés à des médicaments anti-inflammatoires et antimicrobiens. Cependant, bien qu'ils soient efficaces, leurs nombreux effets secondaires, tels que la toxicité systémique importante, la résistance antimicrobienne, la réépithélialisation retardée et le risque d'hypersensibilité, les rendent moins adaptés (**Cialdai et al., 2022**).

Dans le but de pallier les effets indésirables associés aux traitements conventionnels, la médecine traditionnelle, qui repose sur l'utilisation de plantes et de leurs extraits, a émergé comme une alternative potentielle pour la prévention et le traitement de diverses pathologies. On estime que près de 80 % de la population mondiale utilise les plantes comme source de médicaments en raison de leur faible coût, de leur disponibilité, et de leur sécurité perçue (**Parvin et al., 2023**). Cependant, il est important de noter que certaines plantes peuvent également présenter une toxicité, notamment en cas de mauvaise identification, de surdosage ou d'interactions avec d'autres substances.

Certaines plantes, en effet, présentent un potentiel thérapeutique considérable pour soigner les lésions de la peau. La présence de divers composants dans ces produits naturels, notamment des alcaloïdes, des huiles essentielles, des flavonoïdes, des tanins, des terpénoïdes, et des saponines leur confère des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, et antibactériennes, favorisant ainsi la cicatrisation des plaies (**Medellín-Luna et al., 2019**).

Le développement de diverses formulations topiques contenant des phytoconstituants suscite un intérêt croissant en tant que solutions thérapeutiques potentielles pour le traitement des plaies cutanées. En effet, ces formulations topiques représentent le moyen le plus efficace pour délivrer les phytoconstituants directement au site de la blessure, facilitant ainsi le processus de cicatrisation (**Pachau, 2015**). À cet égard, des études récentes ont prouvé l'efficacité de certaines pommades à base d'extraits de plantes sur la cicatrisation des plaies cutanées. Par exemple, l'extrait aqueux de fleurs de *Calendula officinalis* Linn. et l'huile essentielle d'*Ocimum sanctum* L., appliqués sous forme de pommade, ont montré un potentiel cicatrisant significatif dans un modèle d'excision chez les rats (**Gunasekaran et al., 2020 ; Jayapal et al., 2023**).

Populus nigra L., communément appelé Peuplier noir, est un arbre appartenant au genre *Populus*, de la famille des Salicacées (**Guleria et al., 2021**). Les bourgeons floraux de *P. nigra* sont traditionnellement utilisés sous forme de décoction, d'infusion ou de pommade dans le traitement des infections respiratoires, des rhumatismes, des hémorroïdes, des dermatites et de la cicatrisation des plaies (**Muñoz, 2013**). Des études phytochimiques ont démontré la richesse du Peuplier noir en composants bioactifs, notamment les flavonoïdes, tels que le kaempférol, l'apigénine et la pinocembrine, les acides phénoliques dont les acides *p*-coumarique, caféique et férulique (**Stanciauskaite et al., 2021**), les tanins, les terpénoïdes et les alcaloïdes (**Merghache et al., 2016**), qui, par leur pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobien et hépatoprotecteur (**Debbache-Benaida et al., 2013 ; Debbache et al., 2014**) peuvent améliorer considérablement le potentiel de cicatrisation des plaies de *P. nigra*. D'autre part, les bourgeons floraux de *P. nigra* ont montré des propriétés bénéfiques pour la peau, notamment des effets anti-âge (**Dudonné et al., 2011**), éclaircissants (**Maack et Pegard, 2016**) et photoprotecteurs (**Zaidi et al., 2023**). Cependant, à ce jour, aucune étude scientifique n'a été publiée sur leurs vertus cicatrisantes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude dont l'objectif principal est d'évaluer le potentiel cicatrisant *in vivo* d'une formulation de pommade élaborée avec une combinaison de vaseline et d'extrait éthanolique de bourgeons floraux de *P. nigra*.

Ce présent manuscrit est scindé en deux parties structurées comme suit :

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique traitant successivement :

- Quelques aspects liés à la peau, notamment les différentes phases de la cicatrisation.
- L'importance de la phytothérapie, mettant en lumière le potentiel thérapeutique des plantes médicinales dans la gestion de certaines affections.
- Une monographie détaillée de *Populus nigra* et de sa composition en composés phénoliques.
- Les formulations pharmacologiques qui intègrent les extraits végétaux.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale, qui aborde plusieurs axes, notamment :

- L'extraction des composés phénoliques et la détermination de leur teneur par des dosages colorimétriques
- La caractérisation de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* par HPLC-MS
- La détermination du potentiel antioxydant, antiinflammatoire et antibactérien *in vitro* de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*
- La formulation d'une pommade élaborée à partir d'une combinaison de vaseline, choisie comme excipient, et d'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*
- La détermination de l'activité cicatrisante de cette formulation sur un modèle d'excision chez les rats.

Les résultats obtenus ont ensuite été analysés, présentés, discutés et comparés avec des études traitant de sujets comparables. Une conclusion générale a ensuite été présentée, soulignant les principaux résultats obtenus et identifiant d'importantes perspectives de recherche qui pourraient faire suite à ces travaux.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.1. GENERALITES SUR LA PEAU

I.1.1. Définition de la peau

La peau est l'organe protecteur le plus grand du corps. Elle couvre toute la surface externe et agit comme une barrière physique primaire contre l'environnement. Elle représente 15 % du poids total du corps (**Lai-Cheong et McGrath, 2013**). Son pH acide, variant de 4,1 à 5,8 en fonction des régions corporelles, empêche le développement de nombreux pathogènes (**Proksch, 2018**).

La peau joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie physiologique en remplissant une multitude de fonctions essentielles. Il s'agit notamment de la protection contre les rayons ultraviolets, les traumatismes, les agents pathogènes et les toxines, de la thermorégulation, de la sensation, de la synthèse de la vitamine D et de l'auto-réparation ou de la cicatrisation (**McKnight et al., 2022**).

Par ailleurs, les affections cutanées constituent une menace considérable pour le bien-être, la santé mentale et physique et la participation sociale des patients. Elles peuvent entraîner un rejet, comme en témoigne l'apparition de nombreuses affections dermatologiques, notamment le psoriasis, la dermatite ou les cicatrices (**Seth et al., 2017**).

I.1.2. Anatomie de la peau

La peau est une structure hétérogène composée de trois tissus superposés qui sont, de la superficie vers la profondeur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).

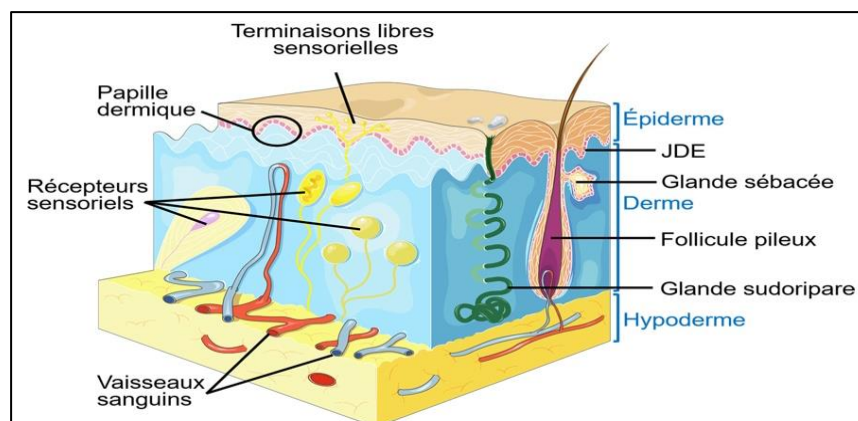


Figure 1 : Anatomie de la peau (**Bessaguet et al., 2022**).

La peau contient diverses annexes cutanées, notamment les glandes et les phanères. Les premières sont classées en glandes sudoripares, qui sécrètent de la sueur, et en glandes sébacées, qui sécrètent du sébum. Les seconds sont les poils et les ongles (**Bessaguet et al., 2022**).

I.1.2.1. Epiderme

L'épiderme représente la couche la plus superficielle de la peau. Il est décrit comme un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux, kératinisé, renouvelable, et non vascularisé, dont les nutriments sont apportés par diffusion à partir du derme. L'épaisseur de l'épiderme varie en fonction de sa localisation, avec des mesures allant de 0,4 à 1,6 mm (**Lotfollahi, 2024**). L'épiderme est composé de quatre couches cellulaires, de la surface la plus profonde à la plus externe, à savoir la couche basale (stratum basale), la couche épineuse (stratum spinosum), la couche granuleuse (stratum granulosum) et la couche cornée (stratum corneum). Néanmoins, une couche supplémentaire est présente au niveau de la peau très épaisse appelée couche claire (stratum lucidum) (Figure 2) (**Graham et al., 2019**).

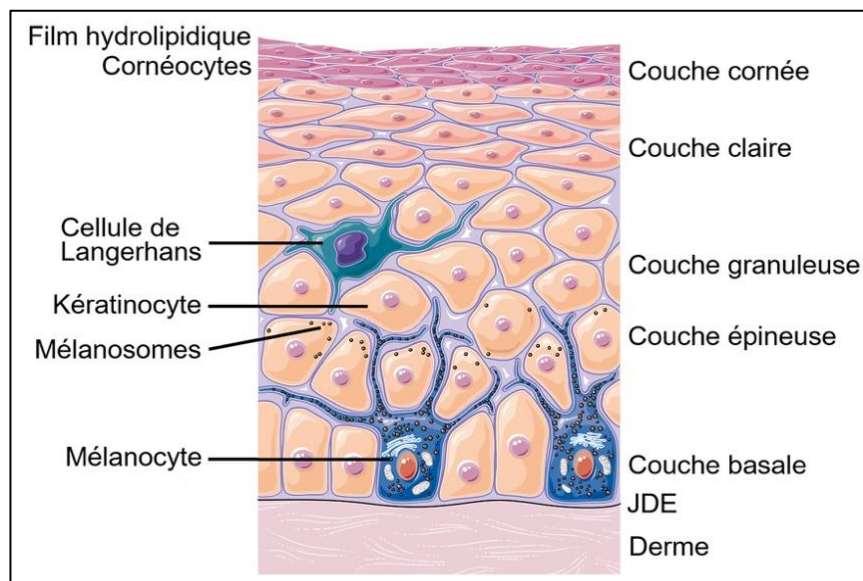


Figure 2 : Les différentes couches de l'épiderme et les cellules épidermiques (**Bessaguet et al., 2022**).

En outre, quatre types distincts de cellules sont présents dans l'épiderme : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Figure 2). Les kératinocytes représentent le type prédominant de cellules épidermiques. Ces cellules produisent de la kératine, une protéine fibreuse, qui assure la fonction protectrice de l'épiderme. Cette fonction est fortement dépendante des propriétés insolubles dans l'eau de la kératine. Les mélanocytes sont les cellules responsables de la synthèse des pigments de mélanine qui

constituent la pigmentation de la peau, des cheveux et des yeux (**Lotfollahi, 2024**). Les cellules de Langerhans sont les cellules immunitaires de l'épiderme chargées de présenter les antigènes phagocytés des microorganismes aux lymphocytes T. Enfin, les cellules de Merkel servent de récepteurs sensoriels, facilitant la transmission des informations sensorielles de la peau aux nerfs sensoriels (**Kolarsick et al., 2011**).

I.1.2.2. Jonction dermo-épidermique

L'épiderme est séparé du derme par une jonction dermo-épidermique composée à la fois de kératinocytes épidermiques et de fibroblastes dermiques. Cette membrane est riche en protéines et glycoprotéines qui assurent l'adhérence entre l'épiderme et le derme. Elle agit comme une barrière sélective qui contrôle les échanges métaboliques et cellulaires entre les deux couches, tout en permettant la diffusion des nutriments des vaisseaux sanguins du derme vers les kératinocytes de l'épiderme. Elle détermine également la réépidermisation lors de la cicatrisation cutanée (**Lai-Cheong et McGrath, 2013**).

I.1.2.3. Derme

Le derme, ou tissu conjonctif lâche, est une structure complexe beaucoup plus épaisse que l'épiderme et contient un réseau de vaisseaux sanguins et de nerfs. Le derme constitue la majeure partie de la peau et lui confère sa souplesse, son élasticité et sa résistance à la traction. Il sert à protéger le corps des blessures mécaniques, à la régulation thermique et à la rétention d'eau (**Lotfollahi, 2024**).

Le derme est composé de deux couches distinctes : la couche papillaire (*stratum papillare*), située sous la jonction dermo-épidermique, et la couche réticulaire (*stratum reticulare*), située au-dessus de l'hypoderme. Il est principalement constitué de fibroblastes, ainsi que de cellules immunitaires, notamment des lymphocytes, des mastocytes et des macrophages (**Lai-Cheong et McGrath, 2013**).

- Fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse, elles constituent la catégorie cellulaire majoritaire du derme. Douées d'une forte activité synthétique, les fibroblastes produisent des composants structurels de la matrice extracellulaire, incluant les fibres de

collagène, d'élastine et de fibrilline, les protéoglycanes, les glycoprotéines, et les enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire. De plus, les fibroblastes interagissent avec les cellules épidermiques et immunitaires, jouant un rôle essentiel dans le maintien des conditions homéostatiques, notamment la cicatrisation des plaies (Bensa et al., 2023).

- Matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire dermique est un ensemble de composants non cellulaires qui fournit un support structural dans lequel les cellules sont intégrées et qui régule de nombreux processus cellulaires, notamment la croissance, la migration, la différenciation, la survie, l'homéostasie et la morphogénèse (Theocharis et al., 2016). La MEC est composée d'une variété de macromolécules matricielles, ses principaux constituants sont des protéines de formation fibreuse, telles que les collagènes, l'élastine, la fibronectine, les laminines, les glycoprotéines, les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes (Figure 3) (Xue et Jackson, 2015).

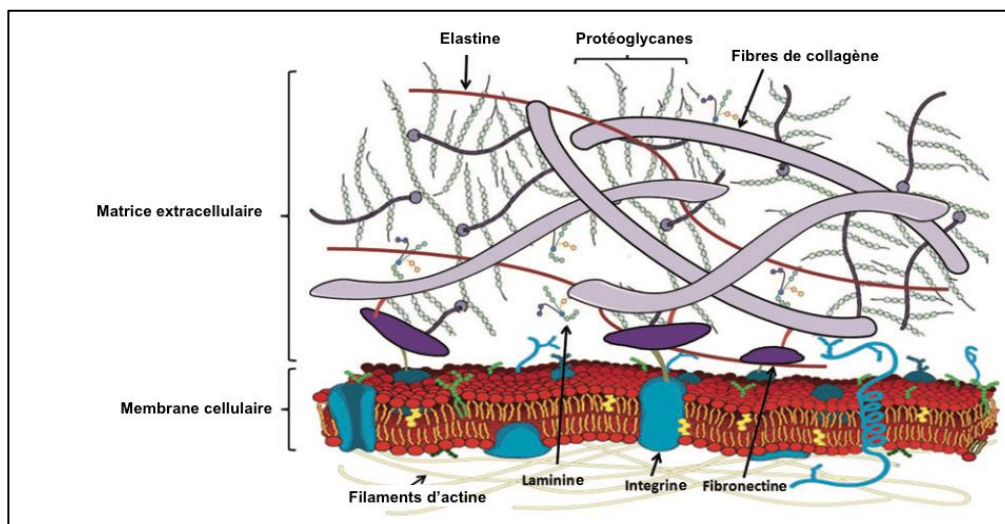


Figure 3 : Principaux composants de la matrice extracellulaire. Traduite de Xue et Jackson (2015).

- Collagène

Le collagène constitue jusqu'à 30 % des protéines totales du corps humain et est la protéine fibreuse la plus abondante de la matrice extracellulaire. Sa synthèse et sa sécrétion dans la MEC est un processus principalement entrepris par les fibroblastes (Theocharis et al., 2016). La superfamille du collagène comprend 28 types distincts, caractérisés par la présence d'une triple hélice. Les trois chaînes polypeptidiques peuvent former des homo- ou hétéro-trimères (Ricard-Blum, 2011). Le collagène est composé de séquences triples hélicoïdales constituées

de répétitions Gly-X-Y, où le X et le Y représentent fréquemment la proline et la 4-hydroxyproline, respectivement (Figure 4).

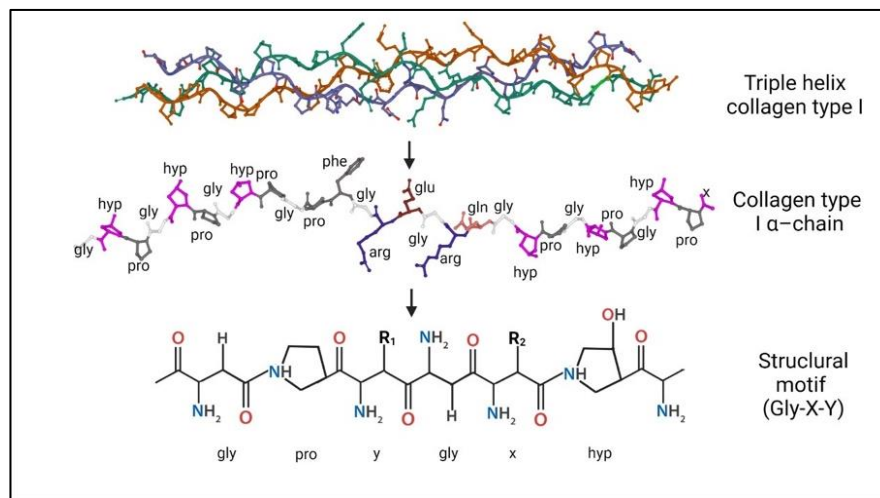


Figure 4 : Structure moléculaire du collagène de type I à triple hélice et à chaîne unique (Amirrah et al., 2022).

La 4-hydroxyproline est un acide aminé synthétisé à partir de l'hydroxylation post-traductionnelle de la proline par la prolyl hydroxylase en présence d'oxygène, d'ascorbate, de Fe^{2+} et d' α -cétoglutarate (Figure 5). C'est un marqueur distinctif du collagène dont la présence est nécessaire pour les liaisons hydrogène intramoléculaires, contribuant ainsi à la stabilité thermique du domaine triple hélicoïdal et, par conséquent, à l'intégrité des monomères et des fibrilles de collagène (Amirrah et al., 2022).

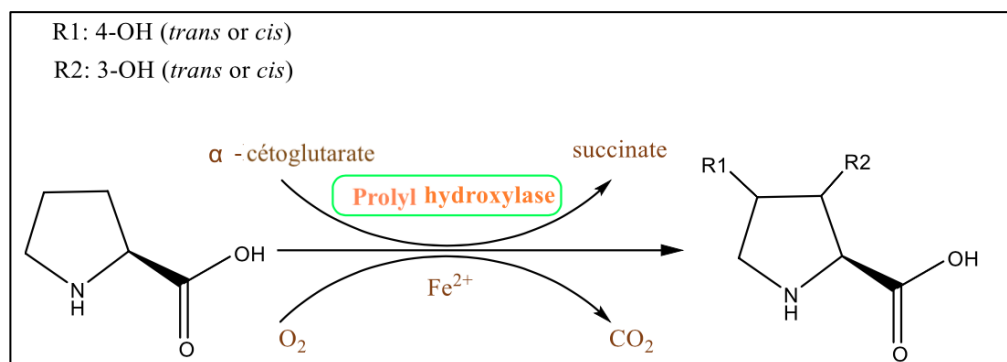


Figure 5 : Hydroxylation de la proline en hydroxyproline (Zhang et al., 2021).

- Glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG) constituent une famille de molécules composées principalement d'hexosamines N-acétylées (N-acétyl-D-galactosamine ou N-acétyl-D-glucosamine) et d'acide hexuronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique). Il en existe six types distincts : le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate, et l'acide hyaluronique (**Theocharis et al., 2016**).

Les glycosaminoglycanes se lient à des protéines pour former des protéoglycanes (PG). Ces derniers sont présents dans les compartiments intracellulaires et à la surface des cellules, mais sont également abondants dans les MEC. En raison de leur capacité à interagir avec d'autres molécules de la MEC et avec les cellules, les PG sont des molécules importantes pour l'organisation de la MEC, contribuant ainsi à la formation de l'échafaudage de la MEC et à l'encastrement des cellules dans cet échafaudage (**Theocharis et al., 2010**). La décorine, l'un des protéoglycanes les plus abondants dans la peau, interagit avec le collagène et régule l'organisation des fibrilles et des faisceaux de fibres de collagène, elle joue un rôle crucial dans la résistance à la traction de la peau en renforçant le réseau de collagène (Figure 6) (**Xue et Jackson, 2015**).

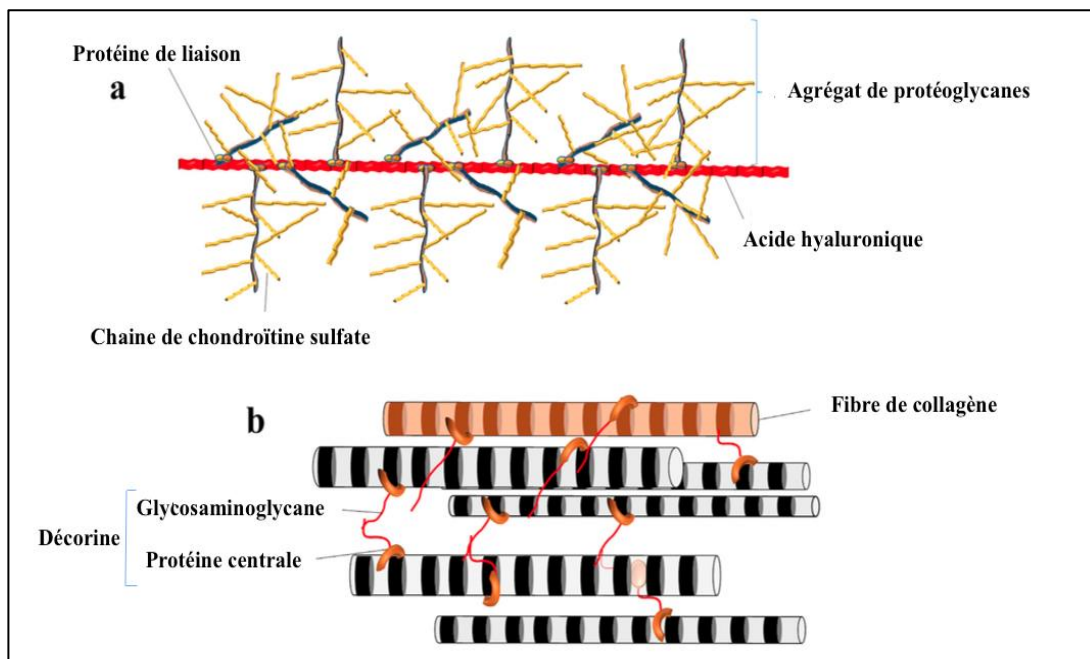


Figure 6 : Organisation des protéoglycanes et glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire. (a) Protéoglycanes de chondroïtine sulfate se combinant avec l'acide hyaluronique. (b) Protéoglycanes (la décorine) organisant leurs interactions avec les fibres de collagène. Traduite de **Karam et al. (2021)**.

I.1.2.4. Hypoderme

L'hypoderme, également appelée couche sous-cutanée, est composé de tissu adipeux riche en vaisseaux sanguins et en graisse. Il sert à stocker les graisses et joue le rôle d'amortisseur pour les organes internes. L'organisation lâche des fibres de collagènes et élastiques assurent la souplesse de la peau (**Lotfollahi, 2024**).

I.1.2.5. Annexes cutanées

Les annexes cutanées regroupent les glandes sudoripares et sébacées ainsi que les phanères.

- Les glandes sudoripares sécrètent de la sueur et sont essentiellement impliquées dans la thermorégulation (**Bessaguet et al., 2022**).
- Les glandes sébacées sont toujours associées à un follicule pileux et sécrètent le sébum, une substance lipidique dont la fonction est la protection de la peau (**Bessaguet et al., 2022**).
- Les phanères regroupent les poils, les cheveux, et les ongles. Les poils et les cheveux ont de nombreuses fonctions biologiques, notamment la protection mais jouent aussi un rôle esthétique. Chaque poil est planté dans un follicule pileux où se situe un muscle arrecteur responsable du redressement du poil après stimulation par le froid ou la peur (**Lai-Cheong et McGrath, 2013**). Tout comme le poil, l'ongle est une structure épithéliale kératinisée qui se forme par modification écailleuse de l'épiderme (**Kolarsick et al., 2011**).

I.1.2.6. Innervation cutanée

La peau et les annexes cutanées sont densément innervées par différentes terminaisons nerveuses qui forment le système nerveux cutané. Celui-ci est constitué du système nerveux autonome efférent et du système nerveux sensoriel afférent (**Bessaguet et al., 2022**). Les neurones efférents innervent les glandes sudoripares et les vaisseaux sanguins. Le système nerveux sensoriel afférent est composé de fibres encapsulées, telles que les corpuscules de Meissner et de Pacini, qui sont responsables de la perception tactile, et de fibres non encapsulées qui sont responsables de la douleur, des démangeaisons et de la sensation de température (**Ständer et Schmelz, 2024**).

I.1.2.7. Vascularisation de la peau

La vascularisation du derme et de l'hypoderme est particulièrement importante, car elle assure une nutrition et une oxygénation adéquates de la peau et de ses annexes. De plus, elle joue un rôle dans la thermorégulation par vasodilatation et vasoconstriction, l'élimination des déchets métaboliques, le maintien de la pression artérielle et de l'équilibre hydrique, et même dans la cicatrisation (**Bessaguet et al., 2022**).

I.1.3. Fonctions de la peau

La peau représente l'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur. Sa fonction première est d'assurer la protection grâce à ses caractéristiques structurelles, notamment la présence d'un épithélium kératinisé dans l'épiderme. Celui-ci forme une barrière contre les agressions chimiques en s'opposant à l'entrée de substances étrangères (**Lotfollahi, 2024**).

Avec la mélanine produite par les mélanocytes, il forme également un filtre chimique contre les rayons ultraviolets qui franchissent la barrière cornée (**McKnight et al., 2022**). De plus, le pH acide de la peau et les cellules immunitaires situées dans l'épiderme lui confèrent un rôle protecteur contre les microorganismes (**Bessaguet et al., 2022**).

La peau joue également un rôle essentiel dans le maintien d'une température corporelle physiologique constante grâce à des mécanismes de thermorégulation impliquant l'hypothalamus, les muscles et les glandes sudoripares (**McKnight et al., 2022**).

Afin de protéger l'organisme des agressions de l'environnement, la peau contient des structures nerveuses sensorielles spécialisées, telles que les corpuscules de Meissner, les corpuscules de Pacini et les fibres nerveuses non encapsulés. Elles recueillent des informations tactiles et permettent de ressentir le chaud ou le froid, ainsi que la douleur (**Gilaberte et al., 2016**). En outre, la peau permet de lutter contre la déshydratation en limitant la diffusion de l'eau hors de l'organisme (**Bessaguet et al., 2022**).

I.2. PLAIE ET CICATRISATION

Une plaie se définit comme une rupture de la continuité anatomique et cellulaire d'un tissu. Cette rupture peut être attribuée à une multitude de facteurs, incluant les brûlures, les radiations, les coupures, les déchirures, les frottements, les pincements, ainsi que les troubles métaboliques (**Irfan-Maqsood, 2018**).

I.2.1. Classification des plaies

Les plaies peuvent être classées selon trois critères principaux : le nombre de couches cutanées touchées, le temps de guérison et la nature de la plaie (**Lodhi et Vadrere, 2017**). Cette classification revêt une importance particulière, car les différents types de plaies peuvent engendrer des complications variées, telles que les infections et des temps de cicatrisation prolongés. En effet, dans les cas les plus sévères, certaines plaies peuvent évoluer vers des formes chroniques qui ne cicatrisent pas, entraînant des dysfonctionnements de la peau (**Zeng et al., 2018**).

En ce qui concerne la profondeur de la plaie, lorsque celle-ci est limitée à l'épiderme, elle est considérée comme superficielle, tandis qu'une plaie affectant la couche dermique implique également des dommages aux vaisseaux sanguins. Une plaie s'étendant à l'hypoderme et au-delà nécessite la synthèse d'un nouveau tissu conjonctif et prendra plus de temps à cicatriser (**Lodhi et Vadrere, 2017**).

Une plaie aiguë est définie comme une plaie qui montre des signes de guérison dans une période de moins de trois mois et de manière ordonnée. Les causes les plus courantes de ces plaies sont des facteurs environnementaux (blessure, brûlure, radiation) impliquant des lésions traumatiques (**Zeng et al., 2018**). En revanche, les plaies chroniques sont causées par des troubles métaboliques tels que les ulcères du pied diabétique et les escarres. Ces plaies mettent beaucoup de temps à guérir et se caractérisent par un déséquilibre dans la production et de la dégradation des composants structurelles cutanés (**Irfan-Maqsood, 2018**).

Les plaies sont également regroupées en diverses catégories en fonction de la nature de l'agression subie, qu'elle soit traumatique, chirurgicale, ou métabolique, elles ont un impact significatif sur la durée et le processus de guérison (**Irfan-Maqsood, 2018**).

I.2.2. Définition de la cicatrisation

La cicatrisation est définie comme un processus physiologique naturel, dynamique, hautement coordonné et régulé, dont le but est de réparer et de régénérer les tissus lésés et de rétablir leur fonctionnalité (Hamdan et al., 2017). Ce processus comprend l'interaction des différents compartiments locaux de la peau, qui fournissent un support à la MEC (Lindley et al., 2016). Le processus de régénération cutanée, en référence à une lésion, se compose de nombreuses phases activées par des voies biochimiques intra et intercellulaires et coordonnées de façon harmonieuse pour restaurer l'intégrité et l'homéostasie des tissus (Hamdan et al., 2017).

I.2.3. Phases de la cicatrisation

Le processus de cicatrisation est décrit comme une série de phases qui se chevauchent partiellement et qui, après l'hémostase, comprennent l'inflammation, la prolifération et, enfin, le remodelage (Figure 7) (Cialdai et al., 2022).

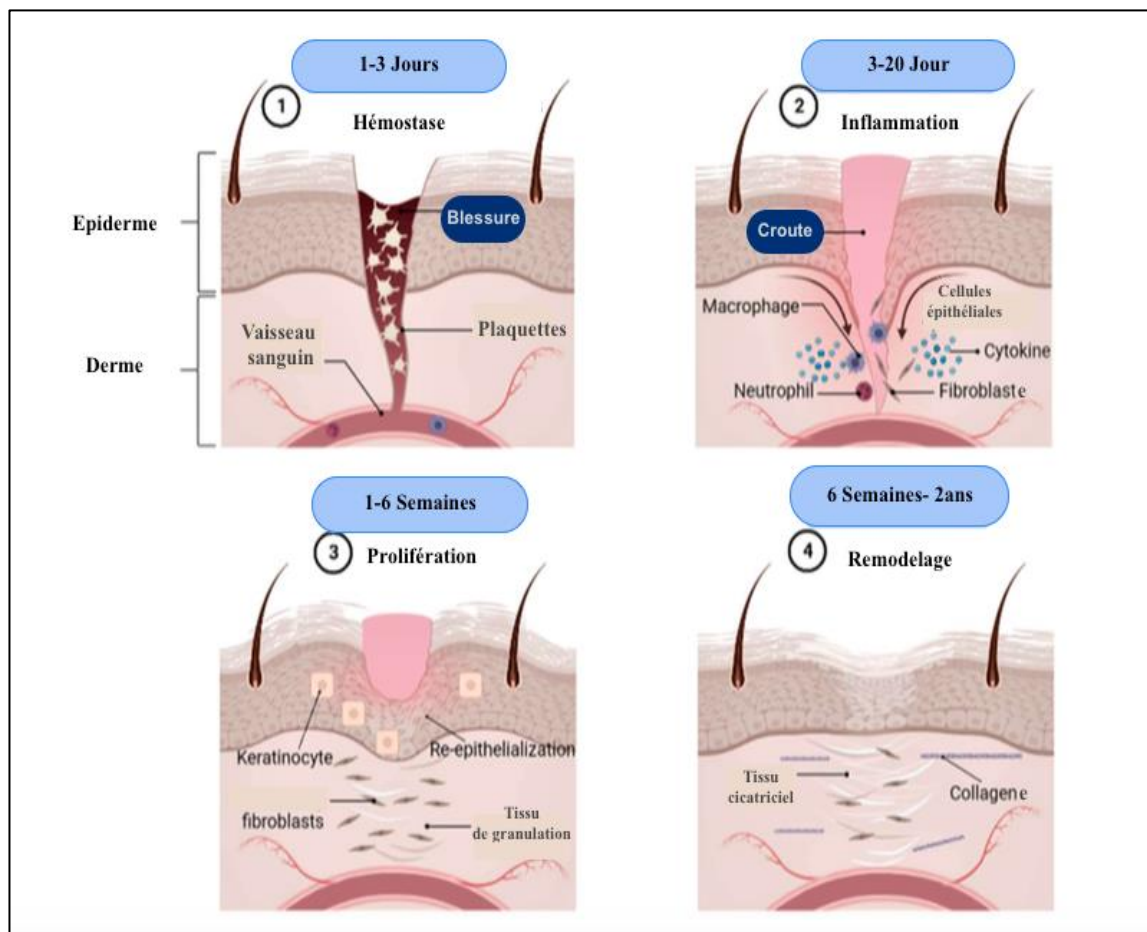


Figure 7 : Phases de la cicatrisation cutanée. Traduite de Zulkefli et al. (2023).

- **Hémostase**

Cette étape survient immédiatement après la blessure et dure une courte période, généralement quelques secondes ou minutes. Elle vise à arrêter l'hémorragie par la contraction des vaisseaux sanguins endommagés et la formation d'un caillot sanguin (Graham et al., 2019). Ainsi, la vasoconstriction est induite par l'endothéline, libérée par l'endothélium endommagé, et par des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (Rodrigues et al., 2019).

Cependant, une activation supplémentaire de la cascade de la coagulation est nécessaire pour réguler davantage la vasoconstriction. Les récepteurs plaquettaires, notamment les glycoprotéines et les intégrines interagissent avec les composants de la MEC, tels que le collagène et la fibronectine, pour faciliter l'adhésion des plaquettes à d'autres plaquettes et à la MEC. De plus les plaquettes activées subissent une transformation structurelle leur permettant de sécréter des substances à partir de leurs granules intracellulaires, telles que la sérotonine, le calcium et l'histamine, qui sont nécessaires à l'activation des plaquettes. Collectivement, ces interactions forment un agrégat plaquettaire (Sorrentino et al., 2015). Ce dernier fournit la surface nécessaire à l'assemblage et à l'activation des complexes de coagulation. Grâce à une cascade de signalisation, les voies de la coagulation intrinsèque et extrinsèque sont activées, et conduisent à l'activation du facteur X qui convertit la prothrombine en thrombine, ce qui entraîne la conversion du fibrinogène en fibrine et la formation d'un caillot de fibrine (Figure 8) (Young et McNaught, 2011).

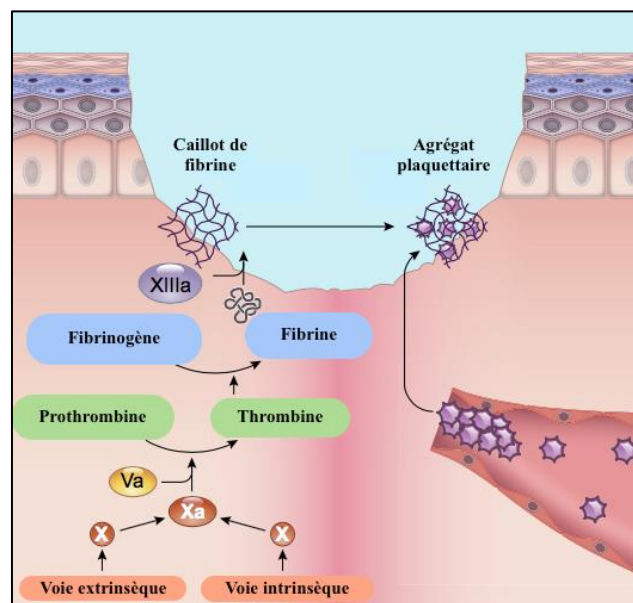


Figure 8 : Formation du caillot de fibrine au cours de la phase d'hémostase. Traduite de Rodrigues et al. (2019).

L'agrégat plaquettaire et le caillot de fibrine se combinent pour former un thrombus qui arrête le saignement, protège contre l'invasion bactérienne, libère des cytokines et des facteurs de croissance, et fournit un échafaudage provisoire pour les cellules nécessaires à la cicatrisation de la plaie (**Rodrigues et al., 2019**).

- **Inflammation**

Après la phase d'hémostase, s'initie la phase inflammatoire, laquelle peut durer pendant une période allant de quelques minutes à plusieurs jours. Cette phase se manifeste par l'apparition de chaleur, de rougeur, et de tuméfaction, qui constituent des signes caractéristiques des plaies (**Young et McNaught, 2011**). En effet, la vasoconstriction qui se produit pendant la phase d'hémostase entraîne une réduction du flux sanguin, qui conduit à son tour à une hypoxie tissulaire. Celle-ci favorise la production de métabolites vasoactifs qui provoquent une vasodilatation des vaisseaux sanguins, facilitant ainsi l'entrée des cellules inflammatoires dans l'espace extracellulaire entourant la plaie, notamment, les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes (**Young et McNaught, 2011**).

L'objectif principal de la réponse inflammatoire est de prévenir l'apparition d'une infection. Ce processus est initié par la libération des motifs moléculaires associés aux lésions par les cellules endommagées et par les motifs moléculaires associés aux pathogènes provenant des éventuels microorganismes (**Chen et DiPietro, 2017**).

Ces motifs induisent l'activation et l'accumulation de cellules immunitaires résidentes sur le site de la plaie, telles que les macrophages, qui peuvent également provenir du recrutement de monocytes se différenciant en macrophages dans la plaie (**Yanez et al., 2017**).

Au début de la réaction inflammatoire, les macrophages sont désignés comme M1. Ces cellules contribuent à l'élimination des tissus nécrosés et des agents pathogènes par la phagocytose et l'expression de molécules pro-inflammatoires, notamment le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et les interleukines (IL)-6 et IL-1. Ces derniers induisent l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) via la voie de signalisation NF- κ B, conduisant à la production des prostaglandines PGE2 et PGI2. L'action des PGE2 et PGI2 sur les tissus endommagés se traduit par des rougeurs et des œdèmes dus à la dilatation artérielle et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Figure 9) (**Kaur et Singh, 2022**).

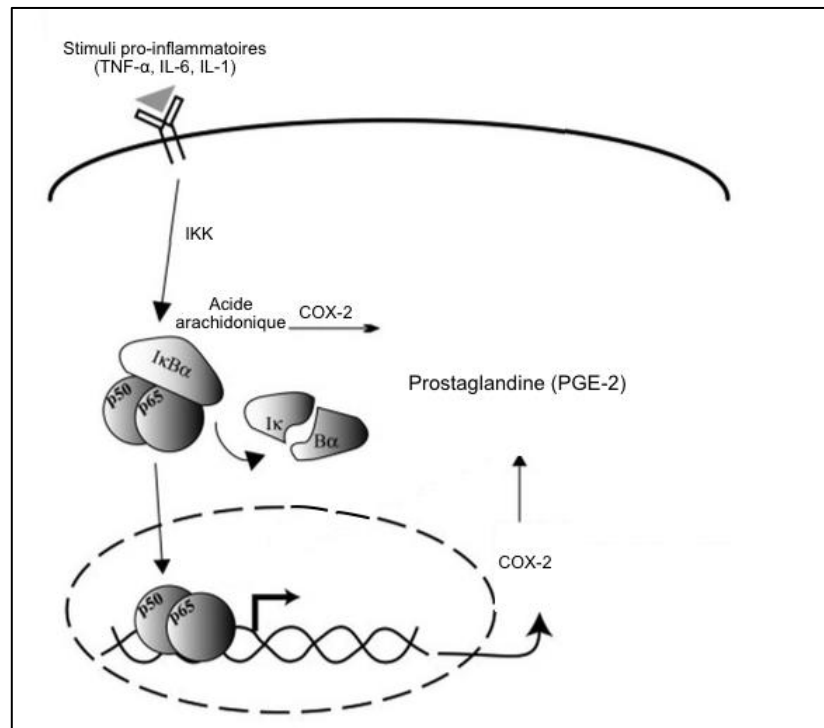


Figure 9 : Voie de signalisation NF-κB. Traduite de **Poligone et Baldwin (2001)**.

COX : Cyclooxygénase, **IKK** : *Inhibitory-κB Kinase*, **IL** : Interleukine, **TNF-α** : *Tumor necrosis factor-α*.

Les neutrophiles via leurs récepteurs de reconnaissance des motifs détectent les motifs moléculaires associés aux lésions et les motifs moléculaires associés aux pathogènes et activent la réponse immunitaire innée. De plus, grâce aux récepteurs d'adhésion des neutrophiles, celles-ci migrent vers le site de la plaie par diapédèse (**Vestweber, 2015**).

Au niveau de la plaie, les neutrophiles éliminent les tissus nécrosés et les agents pathogènes par le processus de phagocytose, par la libération de granules toxiques, et par un mécanisme connu sous le nom de nétose. Ce dernier implique la libération de filaments de chromatine recouverts d'histones, de protéines cytosoliques et de protéases dans l'espace extracellulaire, ce qui permet la capture et l'élimination des microorganismes (**Papayannopoulos, 2018**).

Le cytosol des neutrophiles contient des granules primaires et secondaires, qui renferment un ensemble spécifique d'agents antimicrobiens. Les granules primaires (azurophiles) sont principalement responsables de la destruction des bactéries intracellulaires par le processus de fusion avec le phagolysosome. En effet, les neutrophiles sont capables d'éliminer les bactéries et les débris cellulaires par le processus de phagocytose. Les antigènes reconnus par les neutrophiles peuvent être opsonisés ou non. Lorsque l'antigène est reconnu par le neutrophile, les récepteurs Fc (fragment cristallisable) se rassemblent et activent d'autres récepteurs en aval,

ce qui permet à la membrane plasmique de s'étendre autour de l'agent pathogène et de former une coupe phagocytaire. Le phagosome ainsi formé subit alors une maturation par fusion avec les différents granules primaires, conduisant à la dégradation de l'agent pathogène (**Levin et al., 2016**).

Ces granules contiennent également de la myéloperoxydase et des protéases, telles que la cathepsine G, l'élastase et la protéase 3. Ces dernières jouent un rôle important dans l'activité antimicrobienne et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), notamment l'élastine, la fibronectine, la laminine et le collagène. Cela permet aux neutrophiles de quitter les vaisseaux sanguins et de pénétrer dans le tissu lésé. Les granules secondaires (spécifiques) contiennent la métalloprotéase matricielle 8 (MMP 8), également connue sous le nom de collagénase 2. Cette enzyme clive le collagène fibrillaire (**Wilgus et al., 2013**).

La MPO libérée par les granules primaires dans l'espace extracellulaire au cours de la réaction inflammatoire, entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (**Aratani, 2018**). Les produits initiaux de la réaction inflammatoire sont les anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) produits par la NADPH oxydase et convertis par la SOD en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La MPO par la suite utilise le H_2O_2 pour oxyder plusieurs substrats, tels que les halogénures (Cl^- , Br^-) et les pseudo-halogénures (thiocyanate (SCN^-)) afin de former l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'acide hypobromeux ($HOBr$) et l'acide hypothiocyanique ($HOscn$) (Figure 10) (**Winterbourn et al., 2016**).

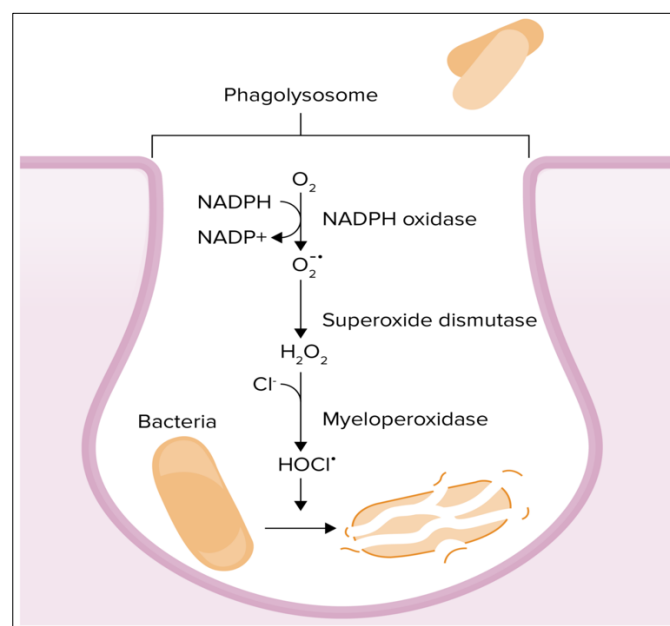


Figure 10 : Réactions chimiques se produisant dans le phagolysosome. Traduite de (**lecturio.com**).

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

Les macrophages sont également essentiels à la régénération des tissus, car ils facilitent l'élimination des neutrophiles. En effet, un afflux de neutrophiles conduit à une production accrue d'enzymes protéolytiques et à au clivage de la MEC, ce qui pourrait potentiellement entraver les processus vasculaires et provoquer des lésions tissulaires (**Rodrigues et al., 2019**).

La résolution de l'inflammation s'accompagne d'une transformation des macrophages pro-inflammatoires en un type de cellule anti-inflammatoire, appelé macrophage M2. Ces macrophages contribuent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins lors de l'angiogenèse en libérant des facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (**Corliss et al., 2016**).

- **Prolifération**

La phase proliférative de la cicatrisation est caractérisée par la formation du tissu de granulation, ainsi que par la réépithélialisation et la néovascularisation (**Wilkinson et Hardman, 2020**).

La néovascularisation est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, elle se produit par l'angiogenèse qui est nécessaire à l'apport de nutriments et au maintien de l'homéostasie de l'oxygène, ce qui favorise la prolifération cellulaire et la régénération des tissus.

Les conditions d'hypoxie du site de la plaie stimulent la libération de facteurs de croissance sensibles à l'hypoxie tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) qui activent les cellules endothéliales qui tapissent la surface interne des vaisseaux sanguins initiant ainsi la néovascularisation (**Eilken et Adams, 2010**).

Les cellules endothéliales sont de trois types : les cellules de pointe, hautement migratoires, qui décomposent la MEC et guident le nouveau bourgeon en croissance ; les cellules de tige prolifératives, qui allongent le nouveau vaisseau ; et les cellules de phalange, qui forment la paroi du vaisseau sanguin (**Wong et al., 2017**).

Enfin, les fibroblastes synthétisent et déposent une nouvelle matrice extracellulaire qui soutient les cellules et les nouveaux vaisseaux sanguins, formant ainsi le tissu de granulation. En effet, les fibroblastes sont stimulés par des facteurs de croissances afin de migrer vers la plaie et synthétiser les composants de la MEC, notamment, le collagène de type I et de type III, les

protéoglycanes, et les fibronectines. Néanmoins, les fibres de collagène formées dans les tissus cicatriciels sont beaucoup plus petites et réparties de manière aléatoire par rapport au collagène dermique des tissus normaux. Par conséquent, la résistance à la traction d'une plaie ne s'approchera jamais de la normale. En fait, la résistance maximale à la traction qu'une plaie peut atteindre est d'environ 80 % de celle de la peau normale (**Tsala et al., 2013**).

L'une des principales caractéristiques de la cicatrisation est la contraction de la plaie, qui permet de réduire sa surface. Au cours de ce processus, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes, qui développent des pseudopodes leur permettant de se connecter aux fibrilles de collagène sur les bords de la plaie, augmentant ainsi la résistance mécanique du tissu (**Schultz et al., 2011**).

Le remplacement des tissus morts ou endommagés par des cellules nouvelles et saines commence par un processus appelé réépithélialisation. Les kératinocytes situés au bord de la plaie entament la transition endothélio-mésenchymateuse en perdant leur connexion desmosomique entre eux et la liaison hémidesmosomique avec la membrane basale. Les kératinocytes sont capables de traverser les débris et les tissus nécrosés de la plaie grâce à la production de protéases, telles que la plasmine, qui facilitent la dégradation des composants fibrinogènes de la plaie. Lorsque les kératinocytes des bords opposés se rencontrent, le processus de migration se termine et une fine couche épithéliale est établie. Les kératinocytes forment alors de nouvelles adhésions à la matrice sous-jacente et la membrane basale se reforme ensuite complètement (**Stone et al., 2016**).

- **Remodelage**

La phase de remodelage peut durer pendant plusieurs mois, voir plusieurs années. Elle est caractérisée par une reconstitution du tissu de granulation en tissu cicatriciel, riche en collagène de type I. En effet, le tissu de granulation est principalement composé de collagène de type III, avec seulement 10 % de collagène de type I, contrairement à la composition en collagène d'une peau adulte non lésée qui est d'environ 80 % de collagène de type I et 10 % de collagène de type III (**Olczyk et al., 2014**).

Au fur et à mesure que la cicatrisation progresse, le collagène de type III est remplacé par du collagène de type I grâce aux MMP exprimées par les macrophages, les fibroblastes et les

kératinocytes, ce qui augmente directement la résistance à la traction de la cicatrice en formation. Toute fois, l'intégrité et l'architecture de la MEC de la cicatrice ne sont jamais complètement restaurées pour atteindre celles d'une peau saine. Effectivement, les fibrilles de collagène dans le derme cicatriciel prennent la forme de grands faisceaux parallèles, alors que dans la peau non lésée, les fibrilles adoptent une orientation en tresse de panier. Ainsi, le tissu cicatriciel ne confère que 80 % de la résistance qu'il avait avant la blessure (**Wilkinson et Hardman, 2020**).

I.2.4. Facteurs influençant la cicatrisation

De nombreux facteurs peuvent influencer le processus de cicatrisation, en le favorisant ou à l'inverse, en entraînant son retard (**Campos et al., 2008 ; Guo et DiPietro, 2010 ; Young et McNaught, 2011 ; Tsioufis et al., 2012**).

- L'état nutritionnel : La malnutrition entrave la cicatrisation des plaies en prolongeant la réponse inflammatoire, en inhibant la fonction des fibroblastes et en réduisant le dépôt de collagène et de nouveaux vaisseaux sanguins. À l'inverse, il a été démontré qu'un certain nombre de nutriments favoriseraient la cicatrisation des plaies, notamment la vitamine A qui est impliquée dans la croissance de l'épiderme, les glucides qui sont nécessaires à la synthèse du collagène, et les acides gras qui modulent la voie de l'acide arachidonique (**Campos et al., 2008**).
- L'hypoxie : Le niveau d'oxygène est vital pour une cicatrisation optimale des plaies. L'hypoxie stimule la cicatrisation, notamment la libération de facteurs de croissance et l'angiogenèse. De la même manière, l'oxygène est nécessaire pour soutenir le processus de cicatrisation car il sert de substrat à l'hydroxylation de la proline. Il a également été démontré que les patients âgés et ceux souffrant d'une maladie vasculaire périphérique présentaient des troubles de la cicatrisation. De même, on a constaté que le tabagisme affecte les pressions d'oxygène et entraîne une augmentation de l'incidence des complications des plaies (**Young et McNaught, 2011**).
- Les infections : La présence de bactéries sur le site de la plaie entraînent la libération de cytokines pro-inflammatoires au cours de la phase inflammatoire. Il est donc important

d'assurer l'élimination efficace de ces microorganismes contaminants. Cependant, en l'absence d'une décontamination efficace, la réponse inflammatoire peut se prolonger, entraînant une modification de l'équilibre des protéases et une dégradation de la matrice extracellulaire. La plaie peut alors entrer dans un état chronique et ne pas cicatriser (**Guo et DiPietro, 2010**).

- L'âge : L'âge avancé constitue un facteur de risque majeur de troubles de la cicatrisation des plaies. En effet, il a été démontré que chaque phase de cicatrisation subit des changements caractéristiques liés à l'âge, par exemple, un retard de la réépithélialisation, de l'angiogenèse et du dépôt de collagène ainsi qu'une diminution de la résistance des plaies a été observée chez des individus âgés (**Young et McNaught, 2011**).
- Les maladies chroniques : Les maladies chroniques qui affectent le système cardiorespiratoire sont susceptibles d'entraver l'apport d'oxygène et d'autres nutriments essentiels nécessaires à une cicatrisation optimale des plaies. En outre, le diabète peut considérablement altérer le processus de cicatrisation, en raison de l'élévation du taux de glucose sanguin qui affecte la fonctionnalité des leucocytes (**Tsioufis et al., 2012**).
- Le facteur génétique : L'origine ethnique pourrait être un facteur contribuant au développement d'altérations cicatricielles. Par exemple, les cicatrices chéloïdes sont plus fréquentes chez les patients d'origine noire, hispanique ou asiatique (**Young et McNaught, 2011**).

I.2.5. Traitements conventionnels

L'efficacité des traitements conventionnels de cicatrisation des plaies dépend d'un certain nombre de variables, notamment le type spécifique de plaie à traiter, les caractéristiques intrinsèques du processus de cicatrisation lui-même et l'état de santé général du patient (**Brumberg et al., 2021**). Ces traitements comprennent l'utilisation de débridements, de pansements, de crèmes, de gels, de sprays et de pommades dermatologiques.

Les débridements, par exemple, implique l'élimination chirurgicale ou mécanique des tissus nécrosés ou infectés dans le cas des ulcères du pied diabétique (**Wilkinson et Hardman, 2020**).

Les pansements contemporains contiennent une myriade de propriétés matérielles pour faciliter la réparation des tissus et incorporent des substances, telles que les alginates, les dextrans et les hydrocolloïdes, qui permettent de retirer l'excès d'exsudat, de maintenir un environnement humide, de prévenir les infections et de favoriser la cicatrisation (**Skorkowska-Telichowska et al., 2013**).

Les applications topiques représentent la méthode la plus courante d'administration de médicaments sur la peau. Elle englobe les gels, les émulsions, les crèmes, les mousses, les lotions et les sprays à base d'ingrédients actifs efficaces, telles que la collagénase ou des facteurs de croissance qui amélioreraient le processus cicatriciel (**Kolimi et al., 2022**).

La majorité des plaies est susceptible d'être contaminée par des bactéries et développe par la suite des biofilms qui entravent la cicatrisation des plaies. *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des bactéries courantes dans les plaies infectées (**Guo et DiPietro, 2010**).

Les traitements conventionnels, notamment les antibiotiques et les anti-inflammatoires, se sont révélés efficaces. Cependant, ces traitements ont des effets secondaires qui peuvent avoir un impact sur les différentes phases du processus de cicatrisation (**Cialdai et al., 2022**).

L'utilisation d'antibiotiques est considérée comme la stratégie fondamentale pour favoriser la régénération des plaies, étant donné le risque élevé d'infection. Néanmoins, le déploiement d'agents antimicrobiens doit être entrepris avec une plus grande prudence, en raison de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et de la toxicité systémique associée à leur utilisation excessive. En outre, on a observé que certains antibiotiques influençaient le processus de cicatrisation de plusieurs mécanismes, notamment l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales, la réduction de la migration des leucocytes et du taux de réépithélialisation, ainsi que la modulation de l'expression des cytokines. De plus, les effets toxiques de certains médicaments sur les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules endothéliales ont également été démontrés (**Punjataewakupt et al., 2019**).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont considérés comme une stratégie thérapeutique importante pour les plaies. Bien que les suppléments de corticostéroïdes soient fréquemment utilisés pour traiter les conditions inflammatoires dermatologiques, leur utilisation à long terme

peut avoir de nombreux effets secondaires négatifs sur la cicatrisation des plaies. On a constaté que les corticostéroïdes réduisaient considérablement les fibres de collagène, épaississaient la peau, limitaient la prolifération des fibroblastes et produisaient des granulomes dans le tissu cicatriciel, réduisaient l'infiltration des leucocytes et la production de macrophages, ce qui retarde la cicatrisation (**Zhao-Fleming et al., 2018 ; Shukla et al., 2019**).

Ces limitations ont rendu nécessaire d'explorer davantage le rôle des thérapies alternatives dans la cicatrisation, qui, dans un futur proche, pourraient devenir plus fiables. Depuis des siècles, les plantes sont utilisées pour traiter diverses pathologies. De nombreuses recherches ont été menées sur les propriétés curatives des produits naturels, qui se sont révélés avoir des actions anti-inflammatoires, antioxydantes et antibactériennes, favorisant aussi la synthèse du collagène. Les propriétés médicinales de ces produits peuvent être attribuées aux constituants phytochimiques bioactifs de différentes familles chimiques, notamment les alcaloïdes, les huiles essentielles, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les terpénoïdes, et les saponines (**Thakur et al., 2011**).

I.3. PHYTOTHERAPIE ET *POPULUS NIGRA*

La phytothérapie est l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales pour le traitement des maladies. Le terme « phytothérapie » est dérivé des mots grecs « *phyton* » qui signifie « plante » et « *therapeia* » qui signifie « traitement ». La phytothérapie s'inspire des pratiques médicinales traditionnelles et s'appuie à la fois sur le savoir populaire et l'expérience scientifique (**Leite et al., 2021**). Actuellement, environ 80 % de la population mondiale a recours à la phytothérapie pour gérer ou traiter diverses maladies (**Izah et al., 2024**).

I.3.1. Plantes médicinales

Les plantes médicinales sont définies d'après la Xème édition de la Pharmacopée française comme « des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses » (**Pharmacopée française, 1983**).

Les plantes médicinales sont utilisées à des fins thérapeutiques depuis des millénaires pour soigner une multitude d'affections. Elles constituent actuellement une forme très recherchée de médecine complémentaire et alternative dans les pays les plus développés et continue de

représenter la première ligne de traitement dans les pays les moins développés, en raison de leur faible coût, de leur facilité d'accès et de l'abondance des phytoconstituants, qui offrent un vaste potentiel en tant que nouveaux médicaments (**Pattnaik et al., 2023**).

À ce jour, un nombre croissant d'études a été réalisé sur les avantages potentiels des extraits de plantes dans le traitement d'une variété de pathologies. Les activités biologiques les plus fréquemment attribuées à divers extraits de plantes sont les propriétés anti-inflammatoire, antimicrobienne, antioxydante et cicatrisante (**Cedillo-Cortezano et al., 2024**).

I.3.2. *Populus nigra*

I.3.2.1. Description botanique de *Populus nigra*

Populus nigra communément appelé Peuplier noir est un grand arbre dioïque en forme de fuseau appartenant à la famille des Salicacées. Il peut atteindre une hauteur de 20 à 40 mètres et peut vivre jusqu'à 300 ans (**Fournier, 2010**).



Figure 11 : Photographie de l'arbre de *Populus nigra* (**Šiler et al., 2014**).

Les caractéristiques morphologiques des différentes parties de cet arbre sont les suivantes : des racines fortes et superficielles qui empêchent la croissance d'autres plantes en dessous, un tronc

possédant une écorce épaisse et fissurée, des feuilles deltoïdes ou ovales, triangulaires et dentées, avec une couleur verte luisante à long pétiole. Les bourgeons sont allongés et pointus, les chatons de fleurs mâles ou femelles sont pendants, entières, alternes deltoïdes ou ovales-triangulaires, et le fruit est une capsule contenant plusieurs graines et entourée d'un duvet blanc qui peut provoquer des réactions allergiques (Beloued, 2001 ; Marnotte et al., 2006).



Figure 12 : Bourgeons de *Populus nigra* (Photographie originale).

I.3.2.2 Classification taxonomique de *Populus nigra*

La dénomination *Populus nigra* provient du mot latin « *Populus* » qui signifie le peuple ou la populaire, l'interprétation serait que le bruissement de ses feuilles dans le vent rappelle le bruit d'une foule. Le mot « *nigra* » signifie noir qui fait référence à son écorce. Dans la Kabylie, il est nommé « Safsaf » ou « Asgharsif » (Beloued, 2001).

La classification taxonomique de *Populus nigra* est décrite comme suit (Šiler et al., 2014) :

Règne : Végétal

Sous règne : Eucaryotes

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Salicales

Famille : Salicacées

Genre : *Populus*

Espèce : *Populus nigra* L.

I.3.2.3 Répartition géographique de *Populus nigra*

L'aire de répartition du Peuplier noir est vaste, elle s'étend à travers l'Europe jusqu'à l'Asie, l'Asie tempérée et aux côtes de l'Afrique du Nord, notamment en Algérie où on le retrouve à El Kala, Tlemcen et la Kabylie, sur les rives des cours d'eau douce, surtout en montagnes (Figure 13) (Beloued, 2001).

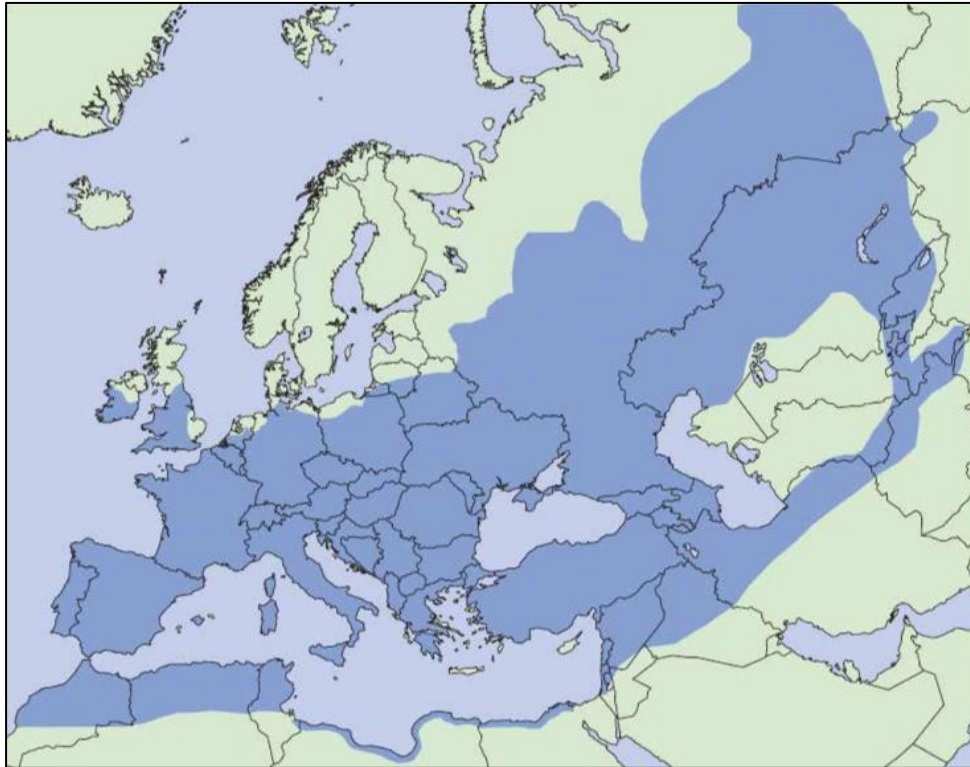


Figure 13 : Répartition géographique de *Populus nigra* (Šiler et al., 2014).

I.3.2.4. Usage traditionnel de *Populus nigra*

En médecine traditionnelle, les différentes parties végétales du genre *Populus*, notamment les rameaux, les écorces, les feuilles et les bourgeons sont utilisées sous forme de décoction, d'infusion pour soigner les troubles respiratoires, la fièvre, le rhume, les douleurs d'estomac, les crampes menstruelles, ou de pommade pour traiter les plaies, l'eczéma et le psoriasis (Bélanger et al., 2019 ; Guleria et al., 2021).

Les bourgeons floraux de *P. nigra* sont employés sous forme de macérât dans le traitement de l'asthme et d'autres troubles respiratoires telles que la bronchite, la toux, les maux de gorge, et la grippe. En outre, ils étaient utilisés comme pommade dans le traitement de problèmes dermatologiques, en particulier les ulcérations, les hémorroïdes et l'inflammation rhumatoïde (**Bruch et Wirth, 1936**). Ils présentent également d'autres propriétés thérapeutiques, notamment des effets diurétiques et antiseptiques (**Schauenberg et Paris, 1974**). De plus, il a été rapporté que les bourgeons floraux de *P. nigra* soulageaient l'inconfort gastrique associé aux ulcères, présentant ainsi des propriétés analgésiques (**Häne et Dobbertin, 2006**).

En Algérie, de nombreuses recherches ont mis en évidence les attributs ethnopharmacologiques de cette plante en étudiant ses propriétés antioxydantes, vasorelaxantes, et hépatoprotectrices (**Debbache-Benaida et al., 2013**), antimicrobiennes (**Debbache et al., 2014**), anti-inflammatoires et anti-hyperuricémiques (**Merghache et al., 2016 ; Debbache et al., 2018 ; Boumghar et al., 2019**). D'autres recherches ont prouvé des propriétés bénéfiques des extraits de bourgeons de *P. nigra* sur la peau, notamment des effets de régénération (**Dudonné et al., 2011**), de dépigmentation (**Maack et Pegard, 2016**) et de photoprotection (**Zaidi et al., 2023**). Ces activités sont attribuées aux métabolites secondaires (composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes) identifiés dans les différents extraits de *P. nigra*.

I.3.2.5. Les composés phénoliques

Les plantes synthétisent deux types de métabolites par le biais de leurs différentes voies métaboliques : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les métabolites primaires, qui comprennent les acides aminés, les glucides et les lipides, sont essentiels à la croissance et au développement des plantes. Ils sont également considérés comme les principaux facteurs influençant la résistance des plantes à divers facteurs de stress environnementaux. En revanche, les métabolites secondaires n'influencent pas directement la croissance et le développement des plantes. Néanmoins, ces métabolites peuvent jouer un rôle défensif important en protégeant les plantes contre des facteurs biotiques tels que les herbivores, les insectes et les agents pathogènes (**Salam et al., 2023**).

Les composés phénoliques, également connus sous le nom de polyphénols, sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, ils jouent un rôle dans la défense contre différents types de stress. Ils offrent une protection contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, les

rayons UV, et les pathogènes. Ils représentent un vaste groupe d'au moins 10000 composés différents, caractérisés par la présence d'un ou plusieurs anneaux aromatiques auxquels sont attachés un ou plusieurs groupes hydroxyles (Figure 14) **(Brglez Mojzer et al., 2016)**.

La synthèse des polyphénols s'effectue à partir des hydrates de carbone par deux voies métaboliques principales : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate. La première voie aboutit à la synthèse des acides aminés aromatiques, qui sont ensuite soumis à une désamination conduisant à la formation d'acides cinnamiques et de leurs dérivés. La seconde voie conduit à la synthèse des polyacétates par condensation de l'acétyl-CoA avec des unités de malonyl-CoA, ce qui mène à la formation de divers composés phénoliques, notamment des flavonoïdes et des stilbènes **(Bertelli et al., 2021)**.

Selon leurs caractéristiques structurales, les composés phénoliques sont divisés en différentes classes dont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes et les lignanes (Figure 14). Plusieurs activités biologiques, notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques et antigénotoxiques sont attribuées à ces composés **(Rambaran, 2020)**.

- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques se distinguent par la présence d'un groupe carboxyle lié au cycle benzénique. Ils sont classés en acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques, qui sont des dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, respectivement **(Kumar et Goel, 2019)**.

- Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne généralement un composé phénolique ayant une structure chimique phénylbenzopyrane composés en C15 disposés en trois anneaux (C6-C3-C6). Les flavonoïdes représentent plus de 6000 composés naturels. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaunes, oranges et rouges de différents organes végétaux. On retrouve plusieurs classes de flavonoïdes entre-autres les flavones, flavanols, flavonols, isoflavones, flavanones et anthocyanidines **(Durazzo et al., 2019)**

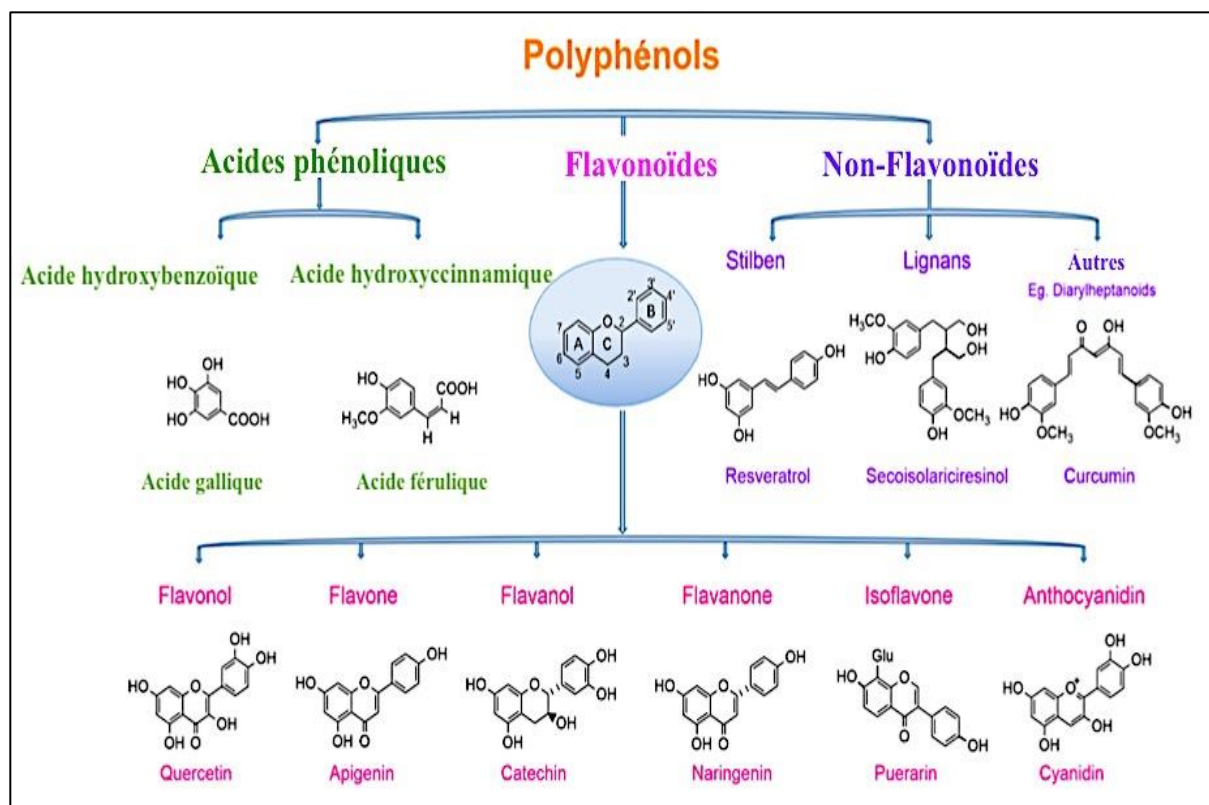


Figure 14 : Classification des composés phénoliques. Traduite de **Rambaran (2020)**.

- Les tanins

Les tanins sont une classe de composés phénoliques polymériques de poids moléculaire moyen à élevé compris entre 500 et 3000 Da, ayant la propriété de précipiter les protéines (**Cowan, 1999**). Les tanins sont divisés en deux groupes : les tanins condensés et les tanins hydrolysables.

Les tanins hydrolysables sont des oligo ou des polyesters de glucose et d'acides phénoliques. On distingue deux sous types, les gallotanins lorsque la partie phénolique est l'acide gallique et les ellagitanins lorsque la partie phénolique est l'acide ellagique. Les tanins condensés ou pro-anthocyanidines sont des oligomères ou polymères d'unités flavan-3-ols dont la variation structurelle est due aux différentes unités, positions, orientations et types des liaisons qui les constituent (**Chung et al., 1998**).

- Les lignanes

Les lignanes sont des composés di-phénoliques présentant un squelette de type $(C_6-C_3)_2$ qui résulte de la combinaison de deux unités phénylpropanoïdes. Parmi les lignanes les plus connus, on trouve le sécoisolariciresinol, le matairesinol et le lariciresinol (**Durazzo et al., 2019**).

- Les stilbènes

Les stilbènes constituent une classe de composés phénoliques caractérisés par une structure de type C6-C2-C6, se définissant par la présence de deux cycles aromatiques reliés par une double liaison. Parmi eux, le resvératrol considéré comme le stilbène le plus connu, il est synthétisé par diverses espèces végétales, y compris le raisin, les arachides et certaines baies (**Singla et al., 2019**).

I.3.2.6. Composition phytochimique de *Populus nigra*

A travers des études phytochimiques, de nombreux auteurs ont pu identifier et prouver la richesse des différents extraits de bourgeons floraux de *P. nigra* en composés phénoliques, notamment en acides phénoliques et leurs esters (acide caféique, *p*-coumarique, férulique, isoférulique, cinnamique, ellagique, et rosmarinique), flavones (apigénine et chrysin), flavonols (kaempférol, galangin et quercétine), flavanones (pinocembrine, pinostrobine et pinobanksine), flavanols (catéchine) et tanins (acide tannique) (**Dudonné et al., 2011 ; Kis et al., 2020**). Ces biomolécules jouent un rôle important dans au moins une phase du processus de cicatrisation. En effet, diverses études *in vitro* et *in vivo* sur la cicatrisation des plaies ont montré que leur utilisation peut stimuler la synthèse du collagène, l'activité pro-angiogénique, l'activité anti-infectieuse, l'effet anti-inflammatoire et l'activité antioxydante, et réduire les risques associés aux troubles de la cicatrisation (**Dziado et al., 2016**).

Les acides phénoliques, reconnus pour leurs propriétés thérapeutiques, ont récemment été employés dans des formulations à usages externes, telles que des pommades topiques, dans le but de faciliter la cicatrisation des plaies. En effet, une étude *in vivo* menée par **Naghavi et al. (2021)** a démontré qu'une pommade à base d'acide cinnamique, à faible concentration (0,1 %), accélérât le taux de cicatrisation de la plaie dans le tissu cutané de lapins ayant subi des excisions. En outre, les résultats ont montré des niveaux élevés d'hydroxyproline, un composant principal du collagène qui est une protéine essentielle de la matrice extracellulaire, dans les échantillons de tissus de lapins traités avec l'acide cinnamique, accompagnés d'une amélioration du processus de néovascularisation tel qu'observé histologiquement. Ces résultats témoignent de l'effet bénéfique de l'acide cinnamique sur la phase proliférative du processus de cicatrisation.

Dans une autre étude, **Sadar et ses collaborateurs (2016)** ont testé l'effet de l'administration de l'acide férulique sur un modèle de colite ulcéreuse induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique chez les rats. Les résultats ont révélé une augmentation notable des niveaux des antioxydants endogènes, à savoir la superoxyde dismutase et le glutathion, accompagnée d'une réduction de l'activité de la myéloperoxydase, de l'expression de l'oxyde nitrique synthase, ainsi que des niveaux du malondialdéhyde. En outre, une atténuation significative de l'expression de l'ARNm colique des molécules pro-inflammatoires, y compris le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 a été observée. De plus, le traitement avec l'acide férulique a entraîné une augmentation marquée de l'expression de l'ARNm de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6, dans les homogénats du côlon (Figure 15) (**Sadar et al., 2016**).

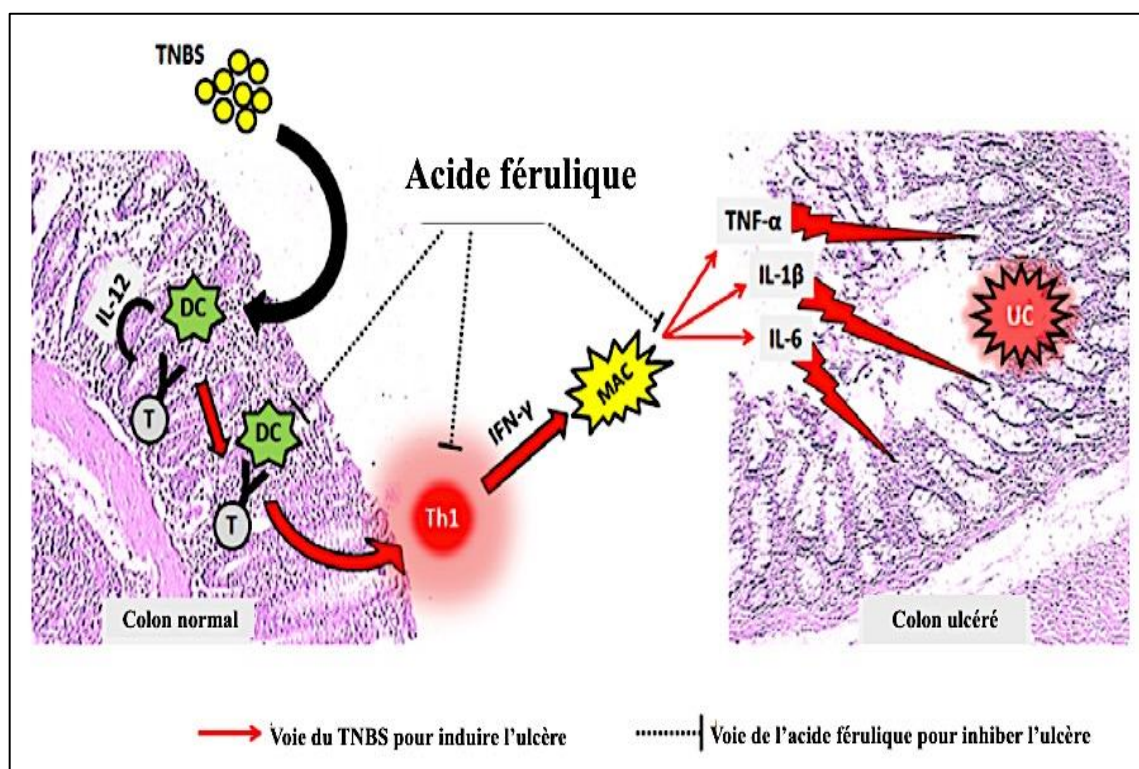


Figure 15 : Mécanisme d'action de l'acide férulique sur l'inhibition de l'inflammation dans un modèle de colite ulcéreuse. Traduite de **Sadar et al. (2016)**.

DC: Dendritic cells. IFN- γ : Interferon gamma. IL: Interleukine. MAC: Macrophage. TNBS: Trinitrobenzenesulphonic acid. UC: Ulcerative colitis. TNF- α : Tumoral necrosis factor.

De nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissent comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation (**Gonzalez- Gallego et al., 2010** ; **Carvalho et al., 2021**). Il a été constaté que les flavonoïdes raccourcissent la phase

inflammatoire et favorisent la cicatrisation des plaies en réprimant l'expression du $TNF\alpha$, de l'IL-1 et en éliminant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Figure 16) (Lephart, 2017). Dans une étude de Mi et al. (2022), il a été démontré que la quercétine augmentait la prolifération et la migration des fibroblastes *in vitro* et accélérât le taux de cicatrisation des plaies en augmentant la teneur en collagène, et en réduisant le niveau de facteurs inflammatoires et en augmentant la teneur en facteurs antioxydants et de facteurs de croissance via la voie de signalisation Wnt/ β -caténine chez la souris ayant subi des excisions cutanées. Cette étude a donc révélé l'effet bénéfique de la quercétine sur plusieurs phases de la cicatrisation des plaies (Mi et al., 2022).

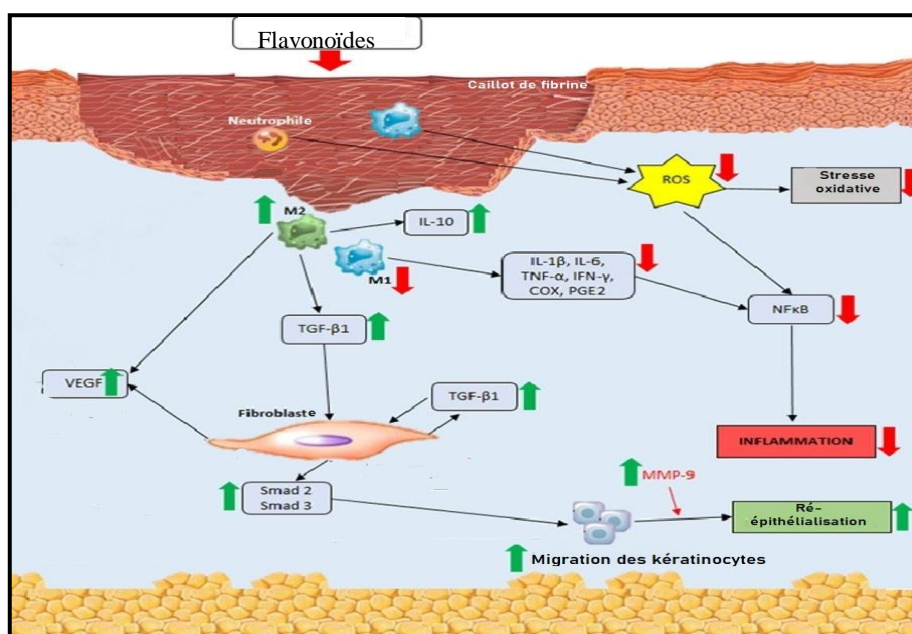


Figure 16 : Mécanisme d'action des flavonoïdes sur la cicatrisation. Traduite de Carvalho et al. (2021). COX : cyclooxygénase. IFN- γ : Interferon gamma. IL : Interleukin. PGE : Prostaglandine E2. TGF- β 1 : Transforming growth factor. TNF- α : Tumoral necrosis factor. VEGF : Vascular endothelial growth factor.

En termes de propriétés cicatrisantes des tanins, une étude a démontré l'effet de l'acide tannique *in vitro* et *in vivo* sur un modèle d'excision sur des rats. Les résultats ont indiqué que l'acide tannique stimulait la sécrétion de facteurs de croissance, notamment le bFGF et activait la voie de signalisation intracellulaire associée ERK 1/2 qui joue un rôle clé dans la médiation de la prolifération, de la différenciation et de la migration de divers types de cellules (Figure 17). Ainsi cette étude prouve que l'acide tannique peut être un agent potentiel pour favoriser la cicatrisation des plaies (Chen et al., 2019).

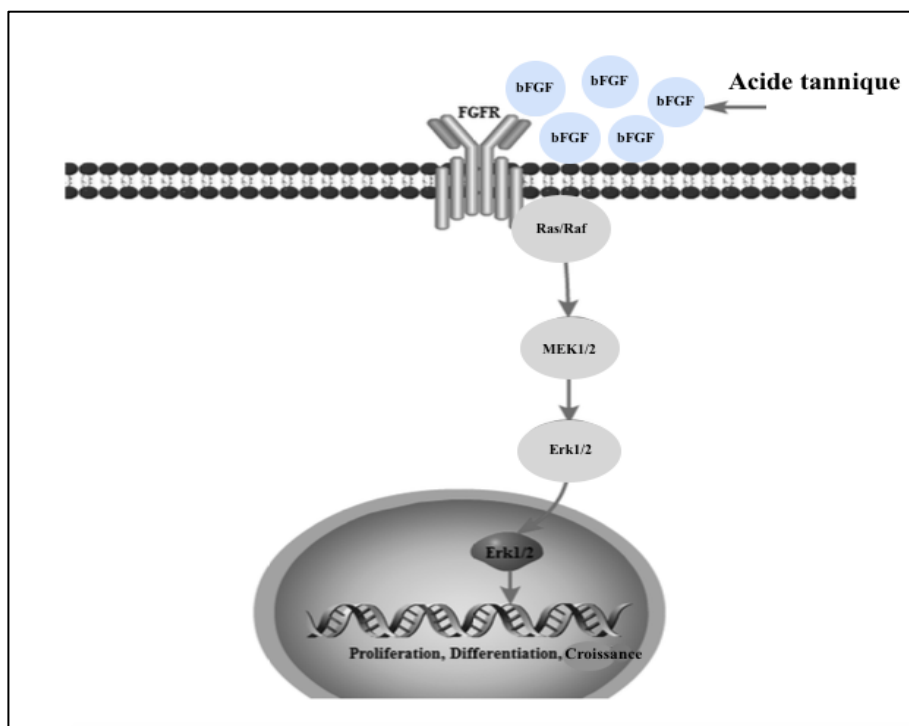


Figure 17 : Mécanisme d'action de l'acide tannique sur la cicatrisation. Traduite de **Chen et al. 2019**).

FGFR: Fibroblast growth factor receptors. **bFGF**: Fibroblast growth factor. **Erk**: Extracellular signal-regulated protein kinase.

La curcumine est un polyphénol dérivé du *Curcuma longa*. Elle est utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses affections, notamment l'asthme, la toux, le diabète, les maladies cardiaques et la cicatrisation des plaies. La curcumine possède des effets antiinflammatoires et antioxydants bénéfiques dans le processus de cicatrisation (**Qadir et al., 2016**). Une étude a été menée sur le potentiel thérapeutique d'un pansement à base d'acide oléique et de curcumine dans la cicatrisation des plaies dans un modèle d'excision chez les rats. Les résultats ont montré une régulation négative de l'expression de la protéine phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et de la protéine kinase B (AKT) ainsi qu'une régulation positive de l'expression de la protéine I κ B α chez les rats traités avec le pansement à base de curcumine (**Mohanty et al., 2012**). Le NF κ B, est un facteur de transcription qui régule l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Il est activé par la phosphorylation des PI3K/AKT en provoquant la libération de la sous-unité inhibitrice I κ B α du complexe NF κ B–I κ B α . La curcumine suivant la voie PI3K/AKT inhibe l'activation et la translocation de NF κ B dans le noyau et régule ensuite à la

baisse la transcription des gènes régulés par NF κ B (Figure 18). Cela indique le rôle positif de la curcumine dans l'inhibition de la phase inflammatoire de la cicatrisation via la voie de signalisation NF κ B (Mohanty *et al.*, 2012).

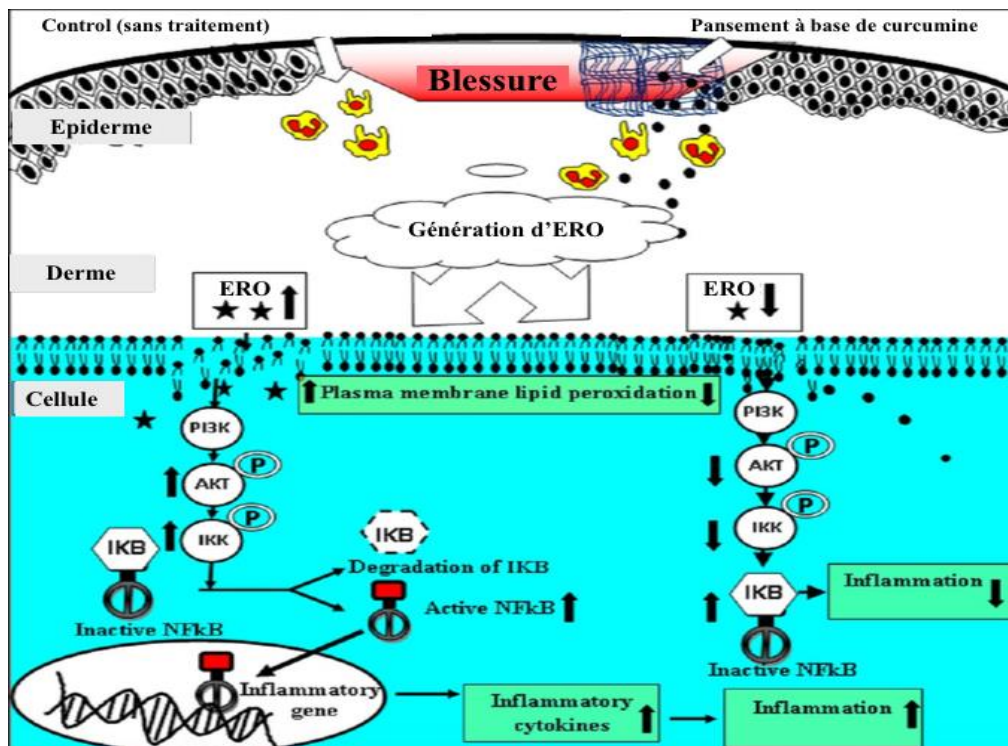


Figure 18 : Mécanisme d'action de la curcumine sur l'inhibition de l'inflammation dans un modèle d'excision chez le rat. Traduite de Mohanty *et al.* (2012).

IKK : Inhibitory- κ B Kinase. **NF κ B** : Nuclear factor-kappa B. **PI3K** : Phosphoinositide 3-Kinase.

I.4. PLANTES MEDICINALES ET FORMULATIONS PHARMACOLOGIQUES

Selon l'Organisation Mondiale de Santé (OMS), environ 40 % des produits pharmaceutiques actuellement disponibles sont basés sur des produits naturels, certains des médicaments phares étant issus de la médecine traditionnelle (**who.int**). En effet, la découverte de l'aspirine était basée sur des formulations de médecine traditionnelle utilisant l'écorce de saule. L'utilisation initiale de la salicine remonte aux Égyptiens et aux Sumériens, qui l'utilisaient sous forme de décoctions préparées à partir de feuilles ou d'écorces de saule. Hippocrate l'a ensuite utilisée pour prévenir l'apparition des douleurs de l'accouchement. Par la suite, elle a été utilisée pour traiter les fièvres. Ce n'est toutefois qu'au XIX^e siècle que le principe actif et les caractéristiques de la salicine ont été découverts. Bien que Charles-Frédéric Gerhardt, chimiste français, ait été

le premier à obtenir de l'acide acétylsalicylique, il ne l'a pas reconnu. C'est Felix Hoffmann qui, par la suite, a redécouvert la molécule et l'a utilisée pour soigner les troubles rhumatismaux de son père (Lévesque et Lafont, 2000).

Les médicaments à base de plantes sont dérivés de plantes médicinales entières ou de leurs parties, et leur efficacité dépend des composants bioactifs (Nasim et al., 2022). Ils peuvent être administrés sous forme de poudre ou de liquide et, selon l'affection, peuvent être ingérés ou appliqués localement sur les parties concernées du corps. Un certain nombre de maladies ont été traitées avec succès par la phytothérapie, notamment, les maladies digestives et respiratoires, le diabète, les problèmes cardiovasculaires (hypertension), les rhumatismes articulaires, les problèmes neurologiques (pertes de mémoire), les maladies de la peau et le cancer (Ahad et al., 2021).

Les composants bioactifs d'une plante médicinale peuvent revêtir une variété de formes, reflétant la diversité des états dans lesquels la plante peut-être utilisée. La matière première peut se présenter sous deux formes : les plantes fraîches, qui servent à l'élaboration de teintures-mères, employées par la suite dans la production de médicaments homéopathiques et les plantes sèches qui constituent la base de la production de poudres et d'extraits (Capasso et al., 2003).

I.4.1. Formes galéniques des médicaments à base de plantes

La forme galénique d'un médicament à base de plante dépend du type d'affection auquel il est conçu et a pour but de faciliter l'administration de l'ensemble des principes actifs de cette plante médicinale. Il existe plusieurs formes galéniques de médicaments à base de plantes, notamment les formes solides, liquides et à usage externe (Izah et al., 2024).

I.4.1.1. Les formes solides

- **Les comprimés** sont des préparations de consistance solide de différentes formes, obtenues par compression de particules de poudres contenant à la fois les principes actifs et les excipients (Kumadoh et Ofori-Kwakye, 2017).
- **Les gélules** sont formées de deux enveloppes cylindriques, rigides et en gélatine, qui s'emboîtent l'une dans l'autre et renferment une dose de poudre ou de granulés

médicamenteux (**Kumadoh et Ofori-Kwakye, 2017**).

- **Les suppositoires** sont des préparations solides, conçues pour être administrées par voie rectale. Leur forme, leur volume et leur consistance sont spécifiquement adaptés à cette utilisation. Ils contiennent un ou plusieurs principes actifs, qui sont dispersés ou dissous dans un excipient qui fond à la température corporelle (**Le Hir et al., 2016**).

I.4.1.2. Les formes liquides

- **Les sirops** sont des préparations liquides contenant une forte proportion de sucre et destinées à être avalées. Ils sont souvent utilisés pour faciliter la prise de médicaments, notamment chez les enfants, en dissimulant le goût amer ou désagréable de certains principes actifs (**Pharmacopée française, 1983**).
- **Les suspensions** sont des poudres contenues dans un flacon dont la substance active ne se dissout pas dans l'eau. Il est important d'agiter la suspension avant chaque utilisation (**Pharmacopée française, 1983**).
- **Les préparations injectables** sont des solutions ou des poudres qui doivent être dissoutes avant d'être administrées. Ces produits sont conçus pour être injectés par voie sous-cutanée, intraveineuse ou intramusculaire (**Le Hir et al., 2016**).

I.4.1.3. Les formes utilisées en usage externe

- **Les pommades** sont des préparations de consistance molle, élaborées en mélangeant un principe actif avec une substance grasse comme la vaseline. Elles sont conçues pour être appliquées sur la peau ou les muqueuses. On distingue les pommades dermiques, ophtalmiques et anales (**Kumadoh et Ofori-Kwakye, 2017**).
- **Les crèmes** sont des émulsions composées d'une phase lipophile et d'une phase aqueuse, le tout ayant une consistance fluide (**Kumadoh et Ofori-Kwakye, 2017**).
- **Les gels** sont des liquides gélifiés à l'aide d'agents appropriés, dont la consistance est visqueuse (**Chabrier, 2010**).

Dans le contexte de ce travail de recherche, les bourgeons floraux de *P. nigra* ont été utilisés pour la formulation d'une pommade à base d'un extrait éthanolique de cette plante afin d'évaluer son potentiel anti-inflammatoire par la mesure de la myéloperoxydase, antioxydant par l'étude de l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase et cicatrisant sur un model d'excision chez les rats.

Chapitre II
Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal « *Populus nigra* »

II.1.1. Récolte

Les bourgeons floraux de *Populus nigra* ont été récoltés au printemps 2021 dans la commune de Amizour, Merdj Ouamane, wilaya de Béjaia (coordonnées GPS JWVC+WP6). L'identification a été faite au niveau du laboratoire de botanique (Université de Béjaia, Algérie) d'après un spécimen d'herbier de référence (N° ph001_43) déposé à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA), Alger, Algérie.

Les bourgeons floraux récoltés ont été séchés dans l'étuve à 37°C, broyés à l'aide d'un broyeur électrique (Kika Labortechnik, Staufen, Germany) puis tamisés jusqu'à l'obtention d'une fine poudre ne dépassant pas 63 µm de diamètre. Afin de mieux la conserver, la poudre a été stockée dans un bocal hermétique et teinté, à -20 °C.

II.1.2. Extraction des composés phénoliques

L'extraction (solide-liquide) des composés phénoliques a été réalisée selon la méthode d'extraction assistée par ultrasons. Une quantité de 10 g de poudre de *P. nigra* a été mélangée à 800 mL d'éthanol (70 %), le mélange a été mis dans un bain à ultrasons (LT-100 PRO) à 40 °C pendant 15 min puis centrifugée à 6000 g pendant 10 min. Le surnageant a été séché à l'aide d'un rotavapeur (Heidholf) à 40 °C, lyophilisé (CHRIST Alpha 1-2 LDplus freeze dryers, Germany) puis l'extrait éthanolique obtenu a été conservé à -20 °C. Le rendement d'extraction a été exprimé en pourcentage d'extrait sec obtenu à partir de la poudre et calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{Poids de l'extrait sec} / \text{Poids de la poudre}) \times 100.$$

II.2. Animaux d'expérimentation et conditions d'élevage

Des rats mâles de souche Wistar (200-300 g) ont été achetés du centre d'élevage de l'institut Pasteur d'Alger. Les animaux ont été placés dans des cages en polystyrène sous des conditions de température ambiante comprises entre 25 et 27 °C, et un cycle de lumière de 12h/12h : obscurité / lumière. Ils ont été nourris avec l'aliment à bouchon et de l'eau du robinet *ad libitum* au sein du laboratoire d'expérimentation animale de l'Université Abderrahmane Mira de

Bejaia. Les rats ont été traités selon les recommandations du comité d’Ethique International (Directive du Conseil Européen (86/609/EC) relative à l’expérimentation animale).

II.3. Produits chimiques

L’acide caféique, la quercétine, la catéchine, l’acide tannique et l’acide gallique ont été approvisionnés chez Chimoza (France). L’éthanol, l’hème, la cyclooxygénase-1 (COX-1), l’acide arachidonique, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), le réactif Folin-Ciocalteu, l’acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (> 98 %), le chloroforme (CHCl₃) (99 %), la caséine, la β-carotène, le réactif Ehrlich's, l’hexosamine, la chloramine T, l’hydroxyproline, la vanilline, l’acide perchlorique, le chlorure de fer l’acétyle acétone, le dichlorhydrate de N,N,N',N'-Tetraméthyl-*p*-phénylènediamine (TMPD) et la trypsine ont été achetés chez Sigma Aldrich (Germany). L’acide chlorhydrique (HCl), les chlorures d’aluminium (AlCl₃) et l’albumine de sérum bovin (BSA) ont été obtenus auprès d’Alpha chemical (India). Le carbonate de sodium (Na₂CO₃), le nitroprussiate de sodium, le naphtyl éthylènediamine, le sulphanilamide et l’acide phosphorique (H₃PO₄) (> 99 %) ont été approvisionnés chez Prolabo (France), la formaldéhyde, le bromure d’hexadecyl triméthylammonium (HTAB) et le tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate (Tris-HCl) (C₄H₁₁NO₃.HCl) chez BIOCHEM Chemopharma (France). La lipoxygénase (LOX) et l’acide linoléique ont été obtenus auprès de Sigma (USA), le peroxyde d’hydrogène (H₂O₂) (30%) auprès de VWR International (France), l’*o*-dianisidine dihydrochloride et l’indométacine chez Sigma-Aldrich (China), et le pyrogallol (C₆H₆O₃) chez Fisher Scientific (UK). Le bouillon Müller-Hinton (70,192-500G) a été acheté chez FLUKA Analytical.

II.4. Détermination de la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tanins

La détermination de la teneur en phénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés et tanins hydrolysables dans l’extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* a été réalisée suivant les méthodes du Folin-Ciocalteu, du chlorure d’aluminium, de la vanilline en présence d’acide chlorhydrique et des chlorures de fer, respectivement.

II.4.1. Dosage des phénols totaux

- **Principe**

La quantité de phénols totaux contenus dans l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* a été déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (**Kähkönen et al., 1999**). Cette méthode est basée sur la réduction du réactif Folin-Ciocalteu de couleur jaune, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. En présence de composés phénoliques, ce réactif est réduit en un mélange d'oxyde de tungstène et de molybdène de couleur bleu dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques oxydés présents dans l'extrait.

- **Mode opératoire**

Le dosage des phénols totaux a été réalisé en mélangeant un volume de 200 µL d'extrait à 1 mL de réactif Folin-Ciocalteu dilué (1 :10) et 800 µL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7,5 %). Après une incubation de 30 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 735 nm. Une courbe d'étalonnage (Annexe N°1) a été réalisée en utilisant l'acide caféique comme standard afin de déterminer la teneur de l'extrait en phénols totaux exprimée en mg équivalent en acide caféique par g d'extrait (mg EAC/gE).

II.4.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La teneur en flavonoïdes contenus dans l'extrait éthanolique a été estimée selon la méthodes de **Maksimović et al. (2005)**, qui repose sur la capacité des flavonoïdes à se complexer avec les chlorures d'aluminium en donnant un complexe de couleur jaune dont l'intensité est mesurée à 430 nm.

- **Mode opératoire**

La réaction consiste à mélanger un volume égale (1 mL) d'extrait éthanolique de *P. nigra* et de chlorures d'aluminium (AlCl_3) (133 mg de chlorure d'aluminium cristallin et 400 mg d'acétate de sodium cristallin dissous dans 100 mL de H_2O) et de les incuber à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance a été mesurée à 430 nm et la teneur de l'extrait en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de la quercétine (Annexe N°2) et exprimée en

mg équivalent en quercétine par g d'extrait (mg EQUÉ/gE).

II.4.3. Dosage des tanins condensés

- **Principe**

La teneur en tanins condensés a été estimée selon la méthode de **Palacios et al. (2021)** qui est basée sur l'interaction du groupement aldéhydique de la vanilline avec le carbone 6 du cycle A de la catéchine formée après dépolymérisation des tanins condensés en présence d'acide chlorhydrique concentré. Cette réaction forme un complexe de couleur rouge qui absorbe à 550 nm.

- **Mode opératoire**

Un volume de 50 µL d'extrait a été mélangé à 1,5 mL de vanilline (4 %) et 750 µL d'HCl concentré. Après une incubation de 20 min à 30 °C, la lecture des absorbances a été effectuée à 550 nm, et la teneur de l'extrait en tanins condensés a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de la catéchine (Annexe N°3) et exprimée en mg équivalent en catéchine par g d'extrait (mg ECA/gE).

II.4.4. Dosage des tanins hydrolysables

- **Principe**

La teneur en tanins hydrolysables a été estimée selon la méthode de **Palacios et al. (2021)**. Cette méthode colorimétrique repose sur la capacité des tanins contenus dans l'extrait de plante à former un complexe avec les ions Fe^{3+} du $FeCl_3$ de couleur rouge violette qui absorbe à 660 nm (**Mailloa et al., 2013**).

- **Mode opératoire**

Ce dosage a été déterminé en mélangeant 1 mL d'extrait et 3,5 mL d'une solution de $FeCl_3$ (0,01 M). Les absorbances ont été mesurées à 660 nm après une incubation de 5 min à température ambiante. Une courbe d'étalonnage (Annexe N°4) a été réalisée en utilisant l'acide tannique comme standard afin de déterminer la teneur de l'extrait en tannins hydrolysables exprimée en mg équivalent en acide tannique par g d'extrait (mg EAT/gE).

II.5. Analyse HPLC-MS

L'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* a été analysé à l'aide d'une chromatographie liquide ultra-performante UPLC (Shimadzu LC-MS 8040) équipée d'une pompe binaire (Nexera XR LC-20AD) et couplée à un spectromètre de masse Q-3 équipé d'une ionisation par Electrospray (ESI). La séparation a été réalisée sur une colonne Restek Ultra C18 (150 mm × 4,6 mm, 3 µm) avec deux combinaisons différentes de solvants comme phase mobile, composée du solvant A (eau/acide formique 0,1 %) et du solvant B (méthanol/acide formique 0,1 %). Les paramètres d'élution consistaient en un débit de 0,4 mL/min et un volume d'échantillon de 5 µL. Le gradient du solvant A était le suivant : 95 % (0,1-2 min), 95 % (2-15 min), 5 % (15-18 min), 5 % (18-20 min), 95 % (20-30 min). Les composés ont été identifiés en comparant leur temps de rétention et leurs spectres de masse avec les étalons phénoliques.

II.6. Evaluation de l'activité cytotoxique sur les érythrocytes

Les échantillons de sang ont été obtenus par prélèvement sur des volontaires sains dans le strict respect des directives du Comité d'Éthique et de Déontologie de l'Université de Béjaïa (agrément IRB numéro 01/C.E.D/UB/2022). Le sang a été centrifugé à 3000 g pendant 10 min, puis le culot contenant les globules rouges a été lavé trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS) (pH 7,4; 0,2 M) et utilisé afin de préparer la suspension érythrocytaire à 5 % (v/v) pour le test de cytotoxicité (Afsar *et al.*, 2016).

- **Principe**

Le test de cytotoxicité sur les globules rouges du sang a été déterminé selon la méthode de **Pagano et Faggio (2015)**. Le principe de ce test est basé sur la capacité de l'extrait de plante à induire des dommages (lyse) sur la membrane des globules rouges. Ainsi, la lyse des hématies provoque la libération de l'hémoglobine, ce qui entraîne la coloration du surnageant en rouge qui absorbe à 540 nm.

- **Mode opératoire**

Un volume de 500 µL de suspension érythrocytaire a été incubé pendant 10 min (37 °C) avec 500 µL d'extrait (0,5-5 mg/mL) préparé dans du PBS isotonique (pH 7,4; 0,2 M). Le mélange a été ensuite centrifugé à 3000 g pendant 10 min, puis le surnageant a été récupéré afin de

mesurer les absorbances à 540 nm. La lyse érythrocytaire en présence d'eau distillée a été considérée comme 100 % d'hémolyse. Le pourcentage d'hémolyse en présence de l'extrait a été calculé selon l'équation suivante : % d'hémolyse = $[(A_1 - A_0)/(A_2 - A_0)] \times 100$, où A_0 et A_1 sont les absorbances de la solution en absence et en présence de l'extrait, respectivement et A_2 est l'absorbance de la solution en présence d'eau distillée (100 % hémolyse).

II.7. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* a été réalisée par les tests du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH), de l'acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS \bullet^+) et du blanchissement de la bêta-carotène.

II.7.1. Test du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil

- **Principe**

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre synthétique stable à température ambiante dont la couleur est violette dans une solution d'éthanol ou de méthanol. Sa réaction avec un antioxydant lui confère la capacité d'obtenir un électron et de subir une réduction, donnant lieu à sa décoloration (Figure 19).

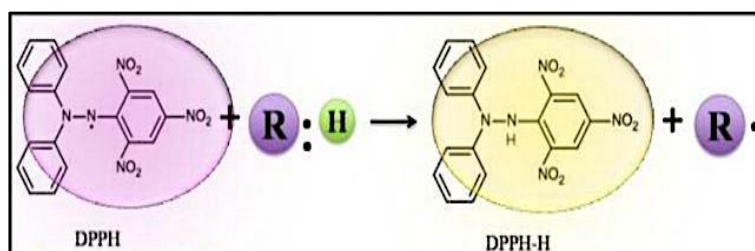


Figure 19 : Mécanisme de réaction du DPPH avec un antioxydant (Goudjil, 2016).

- **Mode opératoire**

L'activité anti-DPPH de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* a été déterminée suivant une méthode modifiée de Rangkadilok *et al.* (2007). Un volume de 20 μ L (3,125-100 μ g/mL) d'extrait ou d'acide caféique (molécule de référence) a été ajouté à 180 μ L d'une solution éthanolique de DPPH (100 μ M). Après une incubation de 30 min à température ambiante dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Synergy-

HTX, Biotek), et le pourcentage d'inhibition (%) du radical DPPH a été calculé selon l'équation suivante: % d'inhibition = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, où A_0 et A_1 sont les absorbances du témoin et de l'extrait/acide caféique, respectivement.

II.7.2. Test de l'acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

- **Principe**

L'ABTS, après activation, est considéré comme étant un radical cationique stable ($ABTS^{\bullet+}$) de couleur bleue qui se décolore quand il réagit avec un antioxydant (Figure 20).

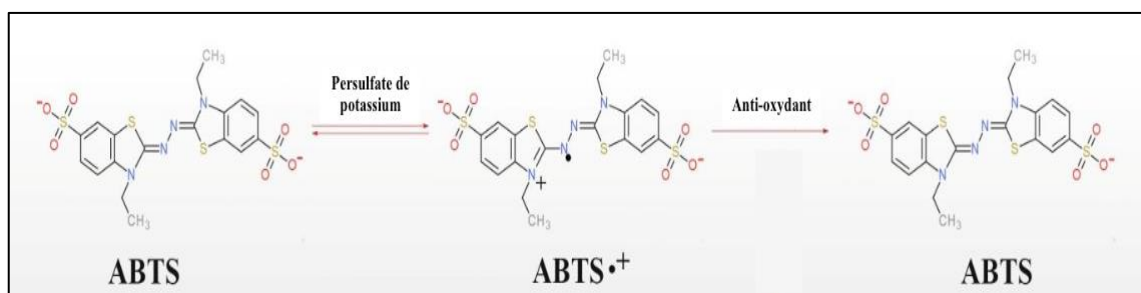


Figure 20 : Mécanisme de réaction de l'ABTS^{•+} avec un antioxydant (Üstündaş *et al.*, 2018).

- **Mode opératoire**

Afin de mesurer l'activité anti-ABTS de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*, la méthode de Ramos *et al.* (2019) a été suivie avec quelques modifications. Une solution contenant de l'ABTS (7 mM) et du persulfate de potassium ($K_2O_2S_8$) (2,45 mM) a été préparée et incubée à l'obscurité et à température ambiante pendant 16-18h. Après incubation, la solution d'ABTS^{•+} obtenue a été diluée dans du PBS (4mM, pH 7,4) et son absorbance ajustée à $0,700 \pm 0,004$ à 734 nm. Dans une microplaque, un volume de 20 μ L d'extrait ou de molécule de référence (3,125-100 μ g/mL) a été ajouté à 180 μ L de solution d'ABTS^{•+}. Après incubation pendant 6 min à température ambiante, les absorbances ont été mesurées. Le pourcentage d'inhibition du radical (%) a été calculé selon l'équation suivante : % d'inhibition = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, où A_0 et A_1 sont les absorbances du témoin et de l'extrait/acide caféique, respectivement.

II.7.3. Test de blanchissement de la bêta-carotène

- **Principe**

La méthode de blanchissement de la β -carotène est basée sur la capacité des espèces réactives de l'oxygène (ERO) à oxyder l'acide linoléique, un acide gras insaturé. Après sa dégradation, celui-ci va produire des radicaux peroxydes, qui à leur tour vont oxyder la β -carotène et induire sa décoloration (Figure 21). Les antioxydants vont empêcher cette décoloration en neutralisant les radicaux peroxydes.

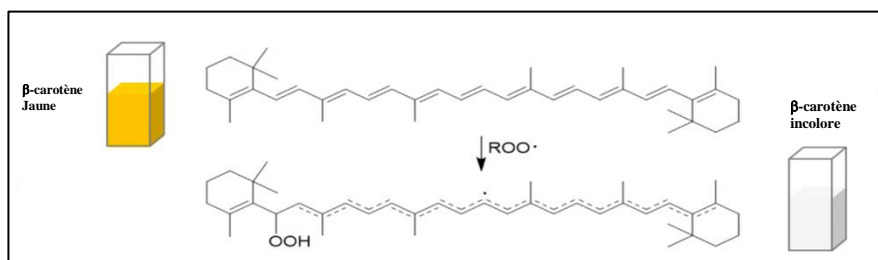


Figure 21 : Processus de blanchissement de la β -carotène (Marchi et al., 2022).

- **Mode opératoire**

Le potentiel antioxydant de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* a été évalué par le test de blanchissement de la β -carotène suivant la méthode de Afsar et al. (2016).

La β -carotène (1,0 mg) a été solubilisée dans 2 mL de chloroforme puis le mélange a été ajouté à 25 μ L d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation totale du chloroforme, 50 mL d'eau distillée ont été ajoutés et mélangés rigoureusement. Sur une microplaque, 100 μ L de la solution de β -carotène ont été ajoutés à l'extrait de *P. nigra* ou la molécule de référence (3,125-100 μ g/mL). Les absorbances ont été mesurées à 460 nm, à $t = 0$ min, puis après 120 min d'incubation à 55 °C. L'activité antioxydante a été calculée en pourcentage d'inhibition (%) selon l'équation suivante : % d'inhibition = $[1 - (A_{t_0} - A_{t_{120}})/(A'_{t_0} - A'_{t_{120}})] \times 100$, où A_{t_0} est l'absorbance de l'extrait/acide caféique à t_0 , $A_{t_{120}}$ est l'absorbance de l'extrait/acide caféique à t_{120} , A'_{t_0} est l'absorbance du témoin à t_0 et $A'_{t_{120}}$ est l'absorbance du témoin à t_{120} .

II.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* a été évaluée par les activités anti-hémolytique, anti-monoxyle d'azote (NO●), antitrypsine, anti-lipoxygénase et anti-cyclooxygénase.

II.8.1. Activité anti-hémolytique

- **Principe**

Au cours de la réaction inflammatoire, la lyse des lysosomes est essentielle à la libération des médiateurs de l'inflammation, néanmoins, une perturbation de la membrane lysosomale peut amplifier l'inflammation. Ainsi, la protection et la stabilisation de cette dernière sont importantes. Le test anti-hémolytique des globules rouges est utilisé pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes *in vitro* en raison de la forte similitude entre la membrane des érythrocytes et celle des lysosomes. Le principe de ce test repose sur la capacité de l'extrait de plante à inhiber la lyse membranaire des globules rouges (Anosike et al., 2012).

- **Mode opératoire**

L'activité anti-hémolytique de l'extrait éthanolique de *P. nigra* a été évaluée selon la méthode de Shabbir et al. (2013), avec quelques modifications. Un volume de 500 µL de la suspension érythrocytaire a été ajouté à un volume égal d'extrait ou d'acide caféique, choisi comme molécule de référence (6,25-100 µg/mL) dissous dans du PBS hypotonique (pH 7,4; 0,2 M), et incubé à 37 °C (10 min). Après incubation, le mélange a été centrifugé à 3000 g pendant 10 min, puis la lecture de l'absorbance du surnageant a été effectuée à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon l'équation suivante : % d'inhibition = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$, où A_0 et A_1 sont les absorbances de la solution en présence du PBS hypotonique et en présence de l'extrait/acide caféique, respectivement.

II.8.2. Activité anti-monoxyle d'azote

- **Principe**

Le nitroprusside de sodium $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$, en solution aqueuse, à un pH physiologique (7,4) et en présence de lumière se décompose en générant du monoxyle d'azote (NO●) qui est

un médiateur de l'inflammation. Dans des conditions d'aérobic, le NO• réagit avec l'oxygène pour produire le nitrate et le nitrite, qui, en présence du réactif de Griess, produisent un complexe de coloration rose dont le maximum d'absorption est à 550nm.

- **Mode opératoire**

Dans le but d'évaluer l'activité anti-monoxyle d'azote (NO•), la méthode de **Abd Ghafar et al. (2018)** a été suivie. Un volume de 50 µL d'extrait ou d'acide caféique choisi comme molécule de référence (3,125-100 µg/mL) a été ajouté à 50 µL de nitroprussiate de sodium (10 mM) préparé dans du PBS (pH 7,4). Après une incubation de 150 min à température ambiante et sous une source lumineuse, 100 µL de réactif de Griess contenant 1 % de sulphanilamide et 0,1 % de naphthylethylenediamine préparé dans 5 % d'acide phosphorique ont été ajoutés. Les absorbances ont été mesurées à 550 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical NO a été calculé selon l'équation suivante : % d'inhibition = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, où A_0 et A_1 sont les absorbances du témoin et de l'extrait/acide caféique, respectivement.

II.8.3. Activité antitrypsine

- **Principe**

Les protéases sont des enzymes contenues dans les granules des neutrophiles pouvant entraîner des lésions tissulaires lors d'une inflammation amplifiée. La trypsine a été choisie pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire car c'est une sérine-protéase responsable de la réaction inflammatoire. Ainsi, le principe de ce test repose sur la capacité de l'extrait de plante à inhiber la trypsine, ce qui induit une diminution de de l'absorbance à 210 nm (**Clancy et al., 2018**).

- **Mode opératoire**

L'activité antitrypsine de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* a été déterminée suivant la méthode de **Leelaprakash et Dass (2011)**. Un volume de 1 mL d'extrait ou d'acide caféique choisi comme molécule de référence (3,125-100 µg/mL) a été mélangé à 2 mL de trypsine (0,3 mg/mL) dissoute dans du Tris-HCl (pH 7,4; 20 mM) et incubé à température ambiante pendant 5 min, puis 1 mL de caséine (0,8 % w/v) a été ajouté. Après 20 min d'incubation, la réaction a été arrêtée par l'ajout d'acide perchlorique (70 %) et centrifugée à 6000 g, l'absorbance du surnageant a été mesurée à 210 nm et le pourcentage d'inhibition de la trypsine a été calculé

selon l'équation suivante : % d'inhibition = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, ou A_0 et A_1 sont les absorbances du témoin et de l'extrait/acide caféique, respectivement.

II.8.4. Activité anti-lipoxygénase

- **Principe**

L'activité inhibitrice de la lipoxygénase (LOX) a été déterminée selon la méthode de **Leelaprakash et Dass (2011)**, qui consiste à mesurer la capacité de l'extrait à inhiber la dégradation de l'acide linoléique par la lipoxygénase, ce qui induit une diminution de l'absorbance de la solution à 234 nm.

- **Mode opératoire**

Un volume de 2,92 mL de tampon borate (0,2 M, pH 9,5) a été mélangé à 10 μ L d'une solution de lipoxygénase (20,000 U/mL) et 30 μ L d'extrait ou d'indométacine choisi comme molécule de référence (6,25-100 μ g/mL). Après une incubation de 5 min à 25 °C, la réaction a été initiée par l'ajout de 40 μ L d'acide linoléique (0,6 mM), puis les absorbances ont été mesurées à 234 nm. Le pourcentage d'inhibition de la LOX a été calculé selon l'équation suivante : % d'inhibition = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, ou A_0 et A_1 sont les absorbances du témoin et de l'extrait/indométacine, respectivement.

II.8.5. Activité anti-cyclooxygénase

- **Principe**

L'activité inhibitrice de la cyclooxygénase (COX-1) a été évaluée par la méthode de **Karim et al. (2019)**, avec quelques modifications. Ce test repose sur la capacité de l'extrait à inhiber la dégradation de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase en présence d'un révélateur, le *N,N,N',N'*-Tetraméthyl-p-phenylenediamine (TMPD), produisant ainsi une décoloration du milieu réactionnel initialement coloré en bleu.

- **Mode opératoire**

Un mélange constitué de 130 μ L de tampon Tris-HCl (pH 8,0 ; 100 mM), 40 μ L d'extrait de *P. nigra* ou d'acide gallique choisi comme molécule de référence (12,5-250 μ g/mL), 10 μ L d'hème (15 μ M) et 10 μ L d'enzyme COX-1 (5 UI) a été incubé dans une microplaque pendant

10 min à 25 °C. La réaction a été initiée par l'ajout de 20 µL d'acide arachidonique et 20 µL de TMPD. L'absorbance a été mesurée à 603 nm avec un lecteur de microplaques (Synergy-HTX, Biotek) et le pourcentage d'inhibition de la COX-1 a été calculée comme suit : % d'inhibition = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, où A_0 et A_1 sont les absorbances de la solution en l'absence et en présence d'extrait/acide gallique, respectivement.

II.9. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* a été évaluée par la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu liquide (Stanciauskaite et al., 2021) contre les souches bactériennes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Les souches *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* ont été repiquées sur leurs milieux gélosés spécifiques, puis des cultures jeunes ont été préparées sur le bouillon Müller-Hinton (37 °C pendant 24 h). La standardisation des suspensions bactériennes obtenues a été par la suite faite dans de l'eau physiologique en accord avec les normes McFarland. Des absorbances comprises entre 0,08 et 0,1 ont été obtenues à 600 nm pour $1 \sim 2 \times 10^8$ UFC/mL. Dans une microplaque, 100 µL de bouillon Müller-Hinton ont été ajoutés à un volume égal d'une série de dilution (1 :2) de l'extrait de *P. nigra* (39-5000 µg/mL) ou de l'ampicilline (7-1000 µg/mL), choisie comme antibiotique de référence, suivi par l'ajout de 100 µL de chaque suspension bactérienne. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, les absorbances ont été mesurées à 660 nm et la CMI₉₀, définie comme étant la concentration la plus faible d'extrait provoquant une inhibition de la croissance à 90 %, a été déterminée.

II.10. Activité cicatrisante *in vivo*

II.10.1. Préparation des pommades

Dans le but d'évaluer l'activité cicatrisante de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*, une méthode de formulation a été préalablement optimisée. Deux pommades ont ainsi été préparées, contenant respectivement 10 et 20 % (g/g) d'extrait, incorporé dans de la vaseline qui a été choisie comme excipient. Pour cela, 10 ou 20 g d'extrait de *P. nigra* ont été

mélangés avec une quantité de 90 ou 80 g de vaseline, respectivement. Par la suite, le mélange a été homogénéisé dans un bain marie à 37 °C, puis les pommades obtenues ont été conservées à 4 °C.

II.10.2. Modèle de cicatrisation par excision

L'activité cicatrisante des pommades formulées à base d'extrait éthanolique de bourgeons floraux de *P. nigra* a été évaluée par le modèle de cicatrisation par excision (**Berhan Begashaw et al., 2017**). Après deux semaines d'adaptation aux conditions de laboratoire, les rats ont été privés de nourriture et d'eau 24 h précédant le début de l'expérimentation. Au premier jour de l'expérience, les animaux ont été pesés, répartis en 5 groupes (n = 10 rats), puis anesthésiés par une injection intrapéritonéale de kétamine (25 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) et traités comme suit :

Groupe I : excisé non traitée (Témoin)

Groupe II : excisé et traité avec une pommade de référence (madecassol)

Groupe III : excisé et traité avec la pommade 10 %

Groupe IV : excisé et traité avec la pommade 20 %

Groupe V : excisé et traité avec l'excipient (vaseline)

Afin de faciliter l'induction de l'excision et de suivre l'évolution de la cicatrisation tout au long de l'expérience, la peau dorsale des rats a été rasée par un rasoir électrique, puis une plaie circulaire de 3 cm de diamètre a été créée par des ciseaux chirurgicaux jusqu'au fascia superficiel. La plaie a été laissée ouverte et chaque rat a été isolé dans une cage individuel afin d'éviter tout risque d'infection.

Les plaies des rats ont été traitées par les pommades formulées à base d'extrait de *P. nigra* 10 et 20 %, la pommade de référence ou par l'excipient de façon quotidienne, à raison d'une fois par jour pendant 14 jours pour quelques rats (n = 5) et pendant 20 jours pour les autres (n = 5). Dans le but de comparer l'évolution de la surface des plaies, celles-ci ont été observées et photographiées tous les jours jusqu'à leur complète cicatrisation. Les observations macroscopiques ont permis d'attribuer un score basé sur l'évolution des plaies en terme d'exsudat, érythème, œdème et formation de la croûte (Tableau I). Le pourcentage de cicatrisation a été calculé selon l'équation suivante :

% de cicatrisation = $(1 - (St/S_0)) \times 100$, où St et S₀ sont les surfaces de la plaie au jour t et au jour 0, respectivement.

Après 14 et 20 jours de traitement, les rats ont été euthanasiés et le sang, le foie ainsi que la peau du site traité ont été récupérés pour des tests biochimiques et histologiques ultérieurs.

Tableau I. Tableau des scores de l'érythème, l'exsudat, l'œdème et la croûte.

Score	Erythème	Exsudat	Œdème	Croûte
0	Absence totale de rougeur	Aucun exsudat	Pas d'œdème	Pas de croûte
1	Légère rougeur, juste visible	Juste visible	Œdème très léger	Début de la croûte
2	Rouge clair	Facilement visible	Œdème visible	Croûte en voie d'épaississement
3	Rouge sombre, par endroits	Quantité consistante	Œdème moyen	Croûte assez épaisse
4	Rouge sombre, très larges	Large quantité	Œdème grave	Croûte très épaisse granuleuse

II.10.3. Étude biochimique

Dans le but d'identifier les mécanismes de cicatrisation induits par les deux pommades à base de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*, les taux de l'hydroxyproline et de l'hexosamine ont été quantifiés et les activités de la MPO, de la SOD et de la CAT ont été mesurées dans les homogénats de tissus cutanés récupérés des rats euthanasiés.

II.10.3.1. Estimation des taux d'hydroxyproline et d'hexosamine

Les teneurs en hydroxyproline et en hexosamine ont été mesurées selon la méthode de **Dwivedi et al. (2017)**, avec quelques modifications. Le tissu de la peau du site excisé récupéré à partir des rats de chaque groupe a été pesé, congelé puis lyophilisé. Par la suite, une quantité de 40 mg de l'échantillon séché a été hydrolysée dans du HCl 6 N pendant 4 h à 120 °C, puis un

volume de 500 μL de l'hydrolysate a été chargé dans des tubes Eppendorf et placé dans l'étuve à 100 °C jusqu'à évaporation totale du HCl.

a). Estimation des taux d'hydroxyproline

- **Principe**

L'hydroxyproline est un acide aminé spécifique du collagène, synthétisé à partir de l'hydroxylation post-traductionnelle de la proline par la prolyl hydroxylase en présence d'oxygène, d'ascorbate, de Fe^{2+} et d' α -cétoglutarate. L'hydroxylation de la proline est essentiel pour la stabilité des hélices du collagène (Wu et al., 2019).

Le principe de la méthode suivie est basé sur la mesure de l'oxydation de l'anneau pyrrolidine de l'hydroxyproline en pyrrole par la chloramine T, qui par la suite agit avec la solution d'Ehrlich pour produire un composé quinoïde de couleur rouge brun intense dont l'intensité est mesurée à 550 nm (Figure 22) (Macovescu et al., 2016).

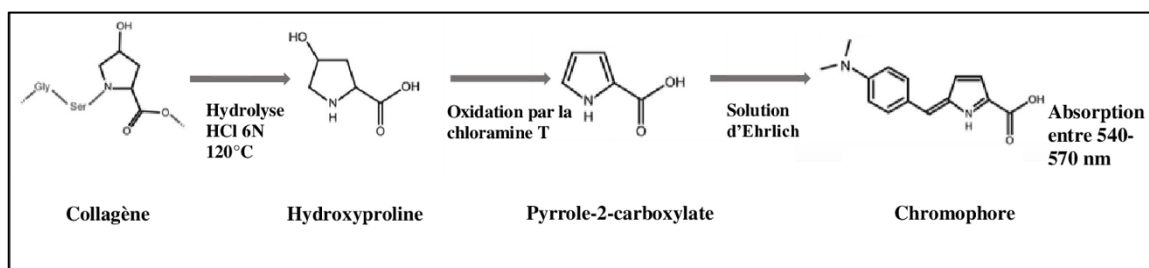


Figure 22 : Principe du protocole de l'estimation des taux d'hydroxyproline (Cissell et al., 2017).

- **Mode opératoire**

Afin d'évaluer la teneur en hydroxyproline des tissus cutanés récupérés du site traité, 1 mL de chloramine T a été ajouté aux Eppendorf contenant l'hydrolysate puis le mélange a été incubé pendant 20 min à température ambiante. Par la suite, 1 mL de solution d'Ehrlich a été ajouté et le mélange a été incubé une deuxième fois pendant 1 h à 60 °C. L'absorbance a été mesurée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et les taux d'hydroxyproline ont été calculés à partir d'une courbe d'étalonnage d'hydroxyproline (Annexe N°5) et exprimés en μg d'hydroxyproline/mg de tissu sec.

b). Estimation des taux d'hexosamine

• Principe

Les hexosamines sont des glucides aminés formés par la substitution d'un groupe hydroxyle -OH d'un sucre hexose par un groupe amine -NH₂. Après acétylation, elles se condensent avec l'acide uronique pour former des glycosaminoglycanes (GAGs) qui sont de majeurs composants de la matrice extracellulaire (Figure 23). Les hexosamines sont synthétisées par les fibroblastes et jouent un rôle dans la stabilité du collagène (**Bandzerevicz et Gadomska-Gajadhur, 2022**).

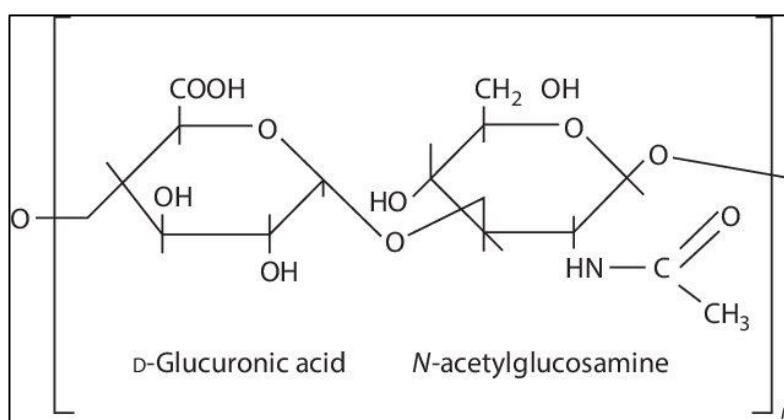


Figure 23 : Structure chimique d'un glycosaminoglycane (Sirisha et D'Souza, 2016).

Le principe de ce test repose sur la méthode de **Elson et Morgan (1933)**, qui est basée sur la conversion des hexosamines en dérivés pyrroliques après réaction avec l'acétyl acétone en milieu alcalin et sous effet de la chaleur. Les dérivés pyrroliques agissent avec la solution d'Ehrlich en présence d'alcool pour produire un composé de couleur rouge brun intense dont l'intensité optique est mesurée à 530 nm.

• Mode opératoire

Afin d'évaluer la teneur en hexosamine des tissus cutanés récupérés du site traité, 1 mL d'acétyl acétone à 2 % a été ajouté puis le mélange a été incubé pendant 15 min à 90 °C. Après refroidissement, 5 mL d'éthanol 95 % et 1 mL de réactif d'Ehrlich ont été ajoutés, mélangés soigneusement et maintenus à température ambiante pendant 1 h. L'absorbance a été mesurée à 530 nm et la quantité d'hexosamine a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe N°6) et présentée en µg d'hexosamine/mg de tissu sec.

II.10.3.2. Estimation de l'activité de la myéloperoxydase

- **Principe**

La MPO est une hème peroxydase présente à des concentrations élevées dans les granules primaires des polynucléaires neutrophiles (**Kisic et al., 2016**). Elle est largement utilisée comme marqueur biochimique de l'inflammation. Outre son activité de peroxydase, la MPO présente une activité de chloration, utilisant le peroxyde d'hydrogène et les ions chlorures pour former l'acide hypochloreux (1).



Le principe du protocole suivi dans la présente étude repose sur la mesure de l'oxydation du dichlorhydrate d'*o*-dianisidine par la MPO en présence du H₂O₂, donnant une coloration orange dont le maximum d'absorption est à 450 nm (Figure 24) (**Rodriguez-Palacios et al., 2015**).

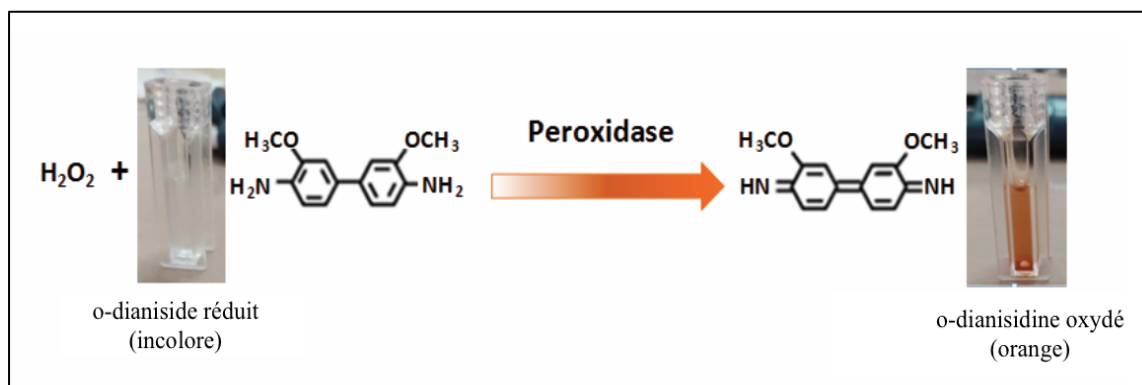


Figure 24: Oxydation de l'*o*-dianisidine par la peroxydase en présence de H₂O₂ (**Senani et al., 2023**).

- **Mode opératoire**

L'activité de la myéloperoxydase (MPO) a été mesurée selon la méthode de **Rodriguez-Palacios et al. (2015)**. Le tissu de la peau guérie récupéré à partir des rats de chaque groupe a été pesé, homogénéisé dans du HTAB à 0,5 % préparé dans du tampon phosphate de potassium (pH 6,0 ; 50 mM) puis centrifugé à 12500 g pendant 5 min à 4 °C. Dans une microplaque, 10 µL de surnageant ont été mélangés à 200 µL de PBS (pH 6,0) contenant 5 mg/mL de dihydrochlorure d'*o*-dianisidine et 10 µL de H₂O₂ (1%). La cinétique enzymatique de la MPO a été suivie à 450 nm pendant 5 min à 25 °C. L'activité de la MPO a été calculée à l'aide de l'équation suivante : Unités d'activité MPO = ΔA₄₅₀ ÷ 0,5 ÷ 0,0113 ÷ 0,05, où 0,0113 est la

constante de la MPO, 0,5 est l'intervalle de temps (30 s, ou 0,5 min) et 0,05 est le facteur de dilution de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en unités MPO par mg (U/mg de protéines).

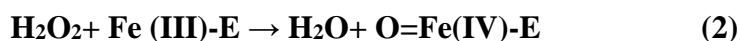
II.10.3.3. Estimation de l'activité des enzymes antioxydants

Afin d'évaluer l'activité de la catalase (CAT) et de la superoxyde dismutase (SOD), les tissus cutanés ont été homogénéisés dans un tampon phosphate 0,1 M (10 % , P/V) à pH 7,4, puis centrifugés à 10000 g pendant 10 min (4 °C).

a). Estimation de l'activité de la catalase

- **Principe**

La catalase est une oxydoréductase hémique dont l'atome de fer de l'hème a la capacité de réaliser une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), créant une molécule d'eau et un groupe Fe(IV)=O (2) hautement oxydant, ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de H₂O₂ pour donner le dioxygène (3) (Clairborne, 1985).



La détermination de l'activité de la catalase a été effectuée en utilisant la méthode de **Alam et al. (2013)**, basée sur la capacité de cette enzyme à dégrader le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en oxygène O₂ et en eau H₂O, induisant ainsi une diminution de l'absorbance à 240 nm.

- **Mode opératoire**

Un volume de 20 µL de surnageant a été ajouté à 380 µL de tampon phosphate de potassium (pH 6,8 ; 100 mM) et 1600 µL de H₂O₂ (37,5 mM). L'activité de la catalase a été calculée à partir de la variation de l'absorbance à 240 nm durant 1 min. Les résultats ont été exprimés en unité (U) représentant 1 µmol de H₂O₂ décomposé/min/mg de protéines, selon l'équation suivante : $U = K/N$, où N est la quantité de protéines présentes dans le volume de l'échantillon utilisé et K est la constante de vitesse de la réaction calculée selon l'équation suivante : $K = (2,303/T) \times \text{Log} (A_1/A_2)$, où 2,303 est la constante de vitesse de la réaction, T est l'intervalle

de temps exprimé en minutes, A_1 est l'absorbance au temps 0 et A_2 est l'absorbance après une minute.

b). Estimation de l'activité de la superoxyde dismutase

- **Principe**

La SOD est une métallo-enzyme qui catalyse la dismutation des ions superoxydes en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (4) (Ho et al., 2001).



Le pyrogallol possède une forme anionique en tant que phénolate qui, en milieu alcalin, est oxydé en produits quinoniques accompagnés par la consommation d'oxygène. Le principe de ce test est basé sur le suivi de la compétition entre la dismutation du radical anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ catalysée par la SOD présente dans les homogénats de peaux et de l'auto-oxydation du pyrogallol qui constitue une source naturelle d'anion $\text{O}_2^{\bullet-}$ sous l'effet de l'oxygène (Figure 25) (Omoruyi et al., 2020).

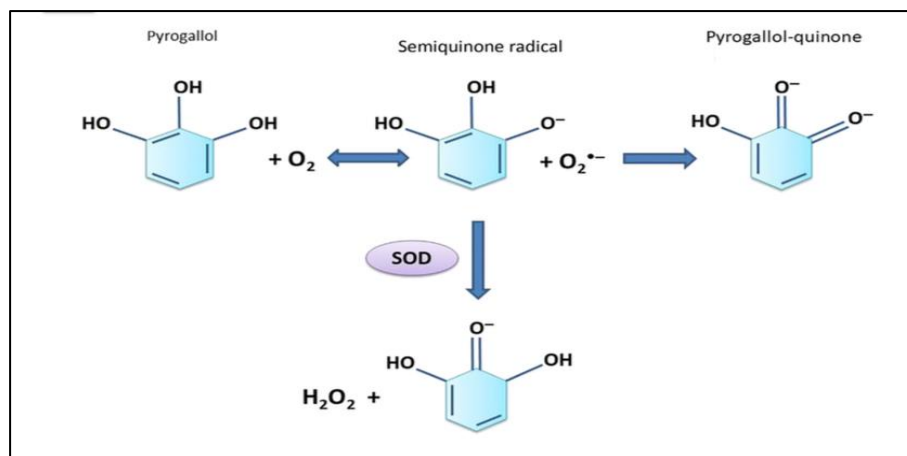


Figure 25 : Auto-oxydation du pyrogallol et son inhibition par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (Omoruyi et al., 2020).

- **Mode opératoire**

L'activité de la SOD a été estimée selon la méthode de Marklund et Marklund (1974). Le mélange réactionnel est formé de 10 μL de surnageant, 1,44 mL de tampon Tris-HCl (pH 8,2 ; 50 mM) contenant 10 mM d'EDTA, et 100 μL de pyrogallol (15 mM). L'absorbance a été

mesurée à 440 nm pendant 3 minutes et l'activité de la SOD a été exprimée en unité (U) par minute par milligramme de protéines et calculée selon les équations suivantes :

$$\% = (1 - (\text{pente échantillon} / \text{pente blanc}) \times 100$$

$$U = (\% / 50 / 3 \text{ min} / \text{mg de protéine})$$

Une unité de SOD a été décrite comme étant la quantité d'enzyme requise pour provoquer 50 % d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol.

II.9.3.4. Estimation de la teneur en protéines

- **Principe**

Afin de quantifier les protéines tissulaires, la méthode colorimétrique de **Bradford (1976)** a été utilisée. Cette méthode repose sur la capacité du réactif Bleu Brillant de Coomassie (BBC) G250 à réagir avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleue dont l'intensité optique est mesurée à 595 nm.

- **Mode opératoire**

Dans des tubes Eppendorf, un volume de 90 µL d'eau distillée et 10 µL d'homogénat de chaque échantillon ont été mélangés, puis 1000 µL de réactif de Bradford ont été additionnés. Après une incubation de 10 min à l'obscurité, les absorbances ont été mesurées à 595 nm. Une courbe d'étalonnage (Annexe N°7) a été réalisée en utilisant la BSA comme standard afin de déterminer la concentration de l'extrait en protéines exprimée en microgramme de protéines.

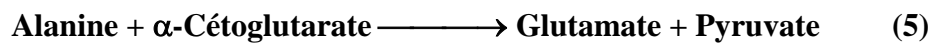
II.10.4. Estimation de l'activité des transaminases dans le sérum sanguin

- **Principe**

Les transaminases, alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST) sont des enzymes intracellulaires, qui sont principalement présentes dans les cellules du foie. En cas de lésions hépatocellulaires, l'activité enzymatique de ces transaminases augmente dans le sang (**Kobayashi et al., 2020**).

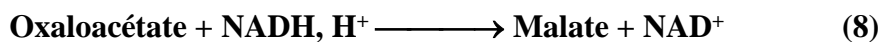
L'alanine aminotransférase (ALT) appelée aussi glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert d'un groupe aminé à partir de l'alanine à l' α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate (5). Le pyruvate produit est réduit en lactate en présence de la lactate

déshydrogénase (LDH) et du NADH,H⁺ (6), selon les réactions suivantes:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH, H⁺, déterminée par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ALT dans l'échantillon.

L'aspartate aminotransférase (AST), appelée aussi glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert d'un groupe aminé à partir de l'aspartate à l' α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate (7). L'oxaloacétate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH,H⁺ (8), selon les réactions suivantes:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH, H⁺, déterminée par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnelle à la concentration catalytique d'AST dans l'échantillon.

• Mode opératoire

Les niveaux de transaminases ont été évalués en prélevant le sang des rats après leur sacrifice aux 14^{ème} et 20^{ème} jour. Après centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes, le sérum a été recueilli pour l'évaluation des niveaux d'alanine aminotransférase (ALT) et d'aspartate aminotransférase (AST) par des kits enzymatiques SPINREACT. Pour cela, 1000 μ L de réactif ont été mélangés à 100 μ L de sérum puis les absorbances ont été mesurées à 340 nm.

II.10.5. Analyse histologique

- Les parties de peau ou de foie des rats récupérées après leur sacrifice aux 14^{ème} et 20^{ème} jour et destinées aux coupes histologiques ont été fixées dans le formaldéhyde 10 % afin de conserver les structures dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, avec arrêt de toutes activités mitotiques et enzymatiques.
- Elles ont été ensuite mises dans des cassettes d'inclusion puis baignées dans huit bains d'éthanol de concentrations croissantes de 70 à 100 % pour une déshydratation des

tissues, dans deux bains de xylène afin d'éliminer toute trace d'éthanol, et enfin dans deux bains successifs de paraffine liquide.

- Les cassettes contenant les échantillons ont été par la suite enrobées dans la paraffine liquide dans des moules d'enrobage. Les moules ont été laissés à refroidir sur une plaque de refroidissement puis les blocs de paraffine ont été démoulés et stockés dans le congélateur pendant 24 h avant l'élaboration des coupes histologiques.
- La confection des coupes histologiques a été réalisée à l'aide d'un microtome (Leika), doté d'une lame très aiguisée permettant d'obtenir de très fins rubans de 3 μm d'épaisseur. L'étalement des rubans a été fait dans un bain marie à 45 °C et le déparaffinage dans l'étuve à 70 °C. Par la suite, les lames contenant les rubans ont été mises dans du xylène pendant 30 min, puis dans de l'éthanol 70 % pendant 10 min, puis dans de l'eau pendant 10 min pour réhydrater le tissu.
- La coloration des échantillons a été réalisée en plongeant les lames pendant 3 min dans un bain d'hématoxyline qui colore le noyau en violet foncé, puis dans un bain d'éosine qui colore le cytoplasme en rouge, un rinçage avec de l'eau courante a été réalisé pour éliminer l'excès de colorant. Les lames ont été par la suite plongées dans trois bains d'alcool à concentration croissante, ensuite dans trois bains de xylène.
- La dernière étape est celle du montage permanent des lames avec les lamelles en utilisant l'EUKITT afin de conserver les coupes histologiques.
- L'observation des lames a été réalisée en utilisant un microscope optique (Leika), les photographies ont été directement enregistrées à l'aide d'un appareil photo intégré et relié à un ordinateur.

II.11. Analyse statistique

Les résultats expérimentaux ont été exprimés en moyenne \pm SD pour les tests *in vitro* et en moyenne \pm SEM pour les tests *in vivo*. L'analyse statistique a été effectuée par le logiciel GraphPad Prism version 9.0.2. Le test de la variance (ANOVA), suivi du test de Tukey a été utilisé pour comparer les résultats et les différences entre les groupes ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

Chapitre III
Résultats et discussion

Les plantes médicinales constituent une ressource naturelle d'une importance capitale pour la santé humaine, en raison de leurs propriétés pharmacologiques, qui sont étroitement liées à la présence de divers agents bioactifs issus de différentes classes chimiques (**Merghache et al., 2016**). Parmi ces plantes, *Populus nigra* a été employée traditionnellement pour ses vertus thérapeutiques, en particulier dans le traitement des troubles respiratoires, des douleurs gastriques et des lésions cutanées (**Bélangier et al., 2019 ; Guleria et al., 2021**). L'objectif de cette recherche est de fournir une validation scientifique des usages traditionnels des bourgeons floraux de *P. nigra* dans le cadre du traitement des plaies, afin de corroborer leur efficacité et d'explorer les mécanismes d'action sous-jacents.

III.1. Extraction et détermination de la teneur en composés phénoliques des bourgeons floraux de *P. nigra*

III.1.1. Méthode et rendement d'extraction

Les bourgeons floraux de *P. nigra* représentent une importante source renouvelable de substances bioactives. L'extraction des composés phénoliques à partir des végétaux est une étape cruciale pour leur récupération et leur valorisation en industrie agroalimentaire, cosmétique ou pharmaceutique. Les procédés les plus couramment utilisés pour l'extraction des polyphénols sont des méthodes classiques qui requièrent l'utilisation de solvants organiques et inorganiques. Etant donné que certains de ces solvants sont toxiques et afin d'éviter les inconvénients des méthodes conventionnelles, de nouvelles techniques ont été proposées. L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est considérée comme un éco-procédé d'extraction dont l'un des avantages est l'amélioration des rendements d'extraction en un temps réduit (**Wen et al., 2020**). C'est pour cette raison que la méthode UAE a été utilisée. En effet, le rendement d'extraction obtenu dans la présente étude est de 34 %, largement supérieur au rendement d'extraction obtenu par **Debbache et al. (2013)** (3,62 %) où la méthode de macération a été utilisée comme méthode d'extraction. Néanmoins, d'autres facteurs influencent le rendement d'extraction incluant le type de solvant, le ratio solide/liquide, la température et la durée d'extraction (**Che Sulaiman et al., 2017**). En effet, en plus de la méthode d'extraction, le ratio solide/liquide utilisé dans cette étude (1/80) est différent de celui de **Debbache et al. (2013)** (1/6). Il convient de noter qu'un rapport solide-liquide plus élevé entraîne une augmentation du rendement d'extraction accompagné par des taux élevés en polyphénols (**Dini et Grumetto, 2022**), car cela favorise le transfert de masse et accélère le processus de diffusion. Toutefois,

en raison des coûts élevés associés à l'utilisation des solvants, des déchets qu'ils génèrent, ainsi que des effets de saturation observés, il est impératif d'optimiser cet équilibre entre des rapports solides-liquides et donc des rendements d'extraction (**Dai et Mumper, 2010**).

III.1.2. Détermination des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires produits par les plantes afin d'assurer leur défense. Ces substances suscitent un intérêt croissant de la part des chercheurs en raison de leur utilité pour la santé humaine dans les domaines de la nutrition, du cosmétique et de la médecine, grâce à leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anticancéreuses, cicatrisantes, anti-vieillessement, anti-allergiques, ainsi qu'à leur pouvoir protecteur contre les maladies cardiovasculaires et dégénératives (**Dini et Grumetto, 2022**).

Dans la présente étude, la détermination des taux de phénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés et tanins hydrolysables a été effectuée à l'aide des méthodes du Folin-Ciocalteu, des chlorures d'aluminium, de la vanilline en présence d'acide chlorhydrique et des chlorures de fer, respectivement. Les résultats sont représentés dans le tableau II.

Tableau II. Détermination des taux de phénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés et tanins hydrolysables dans l'extrait éthanolique de *P. nigra*.

Extrait éthanolique	Phénols totaux (mg EAC/gE) ^a	Flavonoïdes (mg EQ/gE) ^b	Tanins	
			Condensés (mg EC/gE) ^c	Hydrolysable (mg EAT/gE) ^d
	89,55 ± 7,76	14,05 ± 0,36	55,77 ± 0	142,05 ± 2,5

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3). **a** : mg EAC/gE: mg équivalent d'acide caféique par gramme d'extrait; **b** : mg EQ/gE: mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait; **c** : mg EC/gE: mg équivalent de catéchine par gramme d'extrait; **d** : mg EAT/gE: mg équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait.

Dans cette étude, l'utilisation de l'extraction assistée par ultrasons avec de l'éthanol (70 %) a donné lieu à un taux de phénols totaux élevé (89,55 ± 7,76 mg EAC/gE) par rapport aux résultats obtenus par la méthode d'extraction par macération (51,78 ± 4,56 mg EC/gE) (**Debbache-Benaidia et al., 2013**), et par la méthode d'extraction au CO₂ supercritique (31,09 mg EAG/gE) (**Kus et al., 2018**). D'autre part, une teneur inférieure en phénols totaux a été obtenue par la méthode d'extraction par ultrasons en utilisant l'acide lactique comme solvant

d'extraction ($42,64 \pm 0,16$ mg EAG/gE) (**Zaidi et al., 2023**). Par ailleurs, une quantité de phénols totaux comparable à nos résultats ($95,02 \pm 1,93$ mg CAE/g) a été enregistrée par la méthode d'extraction assistée par ultrasons où l'éthanol (70 %) a été choisi comme solvant d'extraction (**Stanciauskaite et al., 2021**). De plus, les valeurs rapportées dans ce travail sont supérieures à celles obtenues par la méthode d'extraction au CO₂ supercritique sur le bois et l'écorce de *P. nigra* ($17,30 \pm 0,94$ mg EAG/gE et $7,00 \pm 0,11$ mg EAG/gE, respectivement) (**Ostolski et al., 2021**), ainsi que celles enregistrées sur les racines et les feuilles par la méthode de macération ($17,5 \pm 1,2$ mg EAG/gE et $12,1 \pm 0,8$ mg EAG/gE, respectivement) (**Hachani et al., 2019**). Le dosage des phénols totaux des extraits hydro-alcooliques d'autres espèces de *Populus* a également révélé des teneurs inférieures aux résultats obtenus dans cette étude avec des valeurs de $20,93$ mg EAG/gE et $5,18$ mg EAG/gE pour les feuilles et les racines d'espèce de *Populus*, respectivement (**Popović et al., 2016**) et $35,7$ mg EAG/gE pour *Populus tremula* (**Golubkina et al., 2022**). Il est à noter que cette différence peut être liée à la différence des molécules de référence utilisées.

Les flavonoïdes sont une classe de composés phénoliques largement distribués dans le règne végétal, souvent présents sous forme glycosidique, ils présentent un fort potentiel antioxydant et interviennent dans la cicatrisation des plaies (**Polera et al., 2019**).

La teneur en flavonoïdes obtenue dans cette étude ($14,05 \pm 0,36$ mg EQ/gE) est comparable à celle rapportée précédemment par **Debbache et al. (2014)** ($13,67 \pm 0,34$ mg EQ/gE), mais plus élevée que les taux enregistrés par **Zaidi et al. (2023)** ($10,07 \pm 0,71$ mg EQ/gE) dans l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra*, ainsi que dans les extraits d'écorce et de bois de la même espèce de Pologne, obtenus par la méthode d'extraction au CO₂ supercritique ($10,28 \pm 0,13$ mg EQ/gE et $0,88 \pm 0,04$ mg EQ/gE, respectivement) (**Ostolski et al., 2021**). De la même manière, les résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits alcooliques et aqueux de *P. nigra* obtenus par **Paşca et al. (2016)** et **Olba-Ziety et al. (2022)** ($5,54 \pm 0,002$ mg EQ/gE et $1,52$ mg EQ/gE, respectivement) sont inférieurs à ceux enregistrés dans ce travail.

Les tanins sont une classe majoritaire de composés phénoliques possédant un poids moléculaire élevé. Ces polymères sont subdivisés en deux groupes, les tanins condensés et les tanins hydrolysables, ils possèdent un pouvoir antioxydant et des propriétés thérapeutiques, notamment en agissant sur la cicatrisation des plaies (**Sharma et al., 2021**).

Dans cette étude, le dosage des tanins dans l'extrait de *P. nigra* a révélé une prédominance des tanins hydrolysables sur les tanins condensés ($142,05 \pm 2,5$ mg EAT/gE et $55,77 \pm 0$ mg EC/gE, respectivement). De plus, le taux de tanins hydrolysables obtenu est supérieur aux teneurs

enregistrées dans les extraits aqueux des feuilles et des racines de *P. nigra* ($10,9 \pm 0,6$ mg EAT/gE et $11,7 \pm 0,8$ mg EAT/gE, respectivement) (**Hachani et al., 2019**), ainsi que dans un extrait de bourgeons floraux du Peuplier obtenu par extraction avec l'acide lactique ($6,75 \pm 0,77$ mg EAT/gE) (**Zaidi et al., 2023**).

De nombreux facteurs influencent les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins présents dans les plantes. Parmi eux, il y a des facteurs intrinsèques à la plante elle-même (origine génétique) qui conduisent à des différences inter-espèces, et des facteurs extrinsèques liés aux conditions environnementales de la plante ainsi qu'aux conditions de conservation après la récolte. En effet, la composition du sol, de même que les conditions climatiques tels que l'exposition au soleil, la température, la disponibilité en eau et la sécheresse affectent le contenu en composés phénoliques de la plante. Le stade de maturité des plantes exerce également une influence significative sur la composition phytochimique. En outre, des changements dans la composition des composés phénoliques peuvent également survenir au cours de la conservation des extraits de plantes, laquelle s'effectue généralement à basse température (**Eseberri et al., 2022**).

La composition en polyphénols des extraits de sources végétales varie également en fonction de facteurs abiotiques tels que la méthode d'extraction, la nature du solvant et le ratio solide/liquide utilisé. Concernant la méthode d'extraction, il a été établi que les ondes ultrasonores induisent une intense cavitation, générant la rupture de la paroi cellulaire des matrices végétales, améliorant ainsi la libération des composés cibles (**Dzah et al., 2020**).

De plus, la température d'extraction influence aussi le rendement en composés phénoliques. En effet, une augmentation de la température induira une augmentation de la porosité des particules de la poudre végétale, une augmentation de la solvatation et du transfert de masse, et une diminution de la tension superficielle et de la viscosité des extraits, ce qui améliore le rendement en composés phénoliques (**Dzah et al., 2020**).

Un autre facteur entraînant une variation de la nature et de la teneur en composés bioactifs extraits est le type de solvant utilisé. Les polyphénols sont majoritairement des molécules hydrosolubles, elles peuvent donc être plus facilement extraites par des solvants polaires tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone, mélangés à des proportions variables d'eau. Il a été rapporté que l'utilisation d'un mélange hydro-alcoolique en particulier l'éthanol serait le système de solvant le plus approprié pour l'extraction des composés phénoliques (**Medina-**

Torres et al., 2017). De plus, l'éthanol est un solvant classé comme généralement comme sûr, en raison de sa faible toxicité par rapport à d'autres solvants (Santos-Buelga et al., 2012).

III.2. Analyse LC-MS

Une analyse HPLC-MS a été réalisée afin de caractériser les composés présents dans l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*. Dans cette étude, l'identification des composés a été basée sur trois critères, le temps de rétention, le poids moléculaire, et la transition M/Z. Les résultats ont été comparés à ceux des standards phénoliques. Les composés identifiés (tableau III) étaient principalement des acides phénoliques (acide férulique, acide coumarique, acide cinnamique), des flavonoïdes (catéchine, myricétine, hespérétine, rutine) et des coumarines (4-hydroxycoumarine, esculine hydratée).

Tableau III : Composés phénoliques identifiés dans l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* par UPLC-ESI-MS/MS.

N°	TR(min)	Nom du composé	Formule moléculaire	Poids moléculaire (g/mol)	Mode d'ionisation	Transition M/Z
1	4,036	4-hydroxycoumarine	C ₉ H ₆ O ₃	162,14	(-)	161>117,1000
2	9,05	Vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	152,15	(+)	153,1000>65,1500
3	12,686	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,27	(+)	291,1000>123,0500
4	13,551	Curcumine	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368,4	(+)	369,0000>177,0000
5	15,386	Acide férulique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	(+)	195>177,1500
6	17,253	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,23	(+NH ₄ ⁺)	336,2500>72,1500
7	17,636	Esculine hydratée	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358,3	(+)	359,1000>295,1500
8	17,640	Hespérétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,28	(-)	301>255,2500
9	19,457	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,5	(+)	611,2000>73,2000
10	20,137	Acide <i>p</i> -coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	(+)	165,1000>101,2000
11	20,286	Acide cinnamique	C ₉ H ₈ O ₂	148,16	(+)	149,0500>84,7500

L'analyse HPLC-MS réalisée dans la présente étude a révélé la présence de composés phénoliques dans *P. nigra*. Les molécules les plus abondantes étaient les acides phénoliques, principalement les acides cinnamique, coumarique et férulique, ce qui est cohérent avec de précédentes études (**Dudonné et al., 2011 ; Stanciauskaite et al., 2021**). Ces composés contribuent de manière significative aux processus de contraction des plaies et de ré-épithélialisation, en stimulant la croissance, la différenciation et la migration des fibroblastes dermiques, ainsi que la néovascularisation (**Melguizo-Rodríguez et al., 2021**). La forte activité antioxydante de l'extrait analysé peut être attribuée à la présence de flavonols hydroxylés, tels que la rutine et la myricétine. Précédemment, l'acide *p*-coumarique a été identifié comme le principal constituant antioxydant de l'extrait de bourgeon de *P. nigra* (**Dudonné et al., 2011**). Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de **Stanciauskaite et al. (2021)**, qui a détecté de la vanilline et des hydroxycoumarines dans *P. nigra* de Lituanie. L'identification de l'esculine dans l'extrait analysé est une nouvelle découverte, soutenue par la détection récente de l'esculetin, un dérivé de l'esculine, dans l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* d'Algérie (**Zaidi et al., 2023**). L'esculine est principalement un composé anti-inflammatoire, qui est abondant dans l'écorce des espèces de *Fraxinus* (**Ahmane et al., 2019**). Cette molécule possède également des propriétés thérapeutiques sur les affections cutanées (**Liang et al., 2017**).

III.3. Évaluation de l'activité cytotoxique sur les érythrocytes

Les globules rouges ont été choisis comme modèle pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro* en raison de la facilité de leur isolement. Les propriétés hémolytiques d'un agent sont attribuables à ses interactions avec les différents composants de la membrane érythrocytaire, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire et des mouvements d'ions. L'afflux de sodium et d'eau dans la cellule, accompagné d'un efflux de potassium, entraîne la rupture de la membrane cellulaire, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine (**Manaargadoo-Catin, 2015**).

Le test hémolytique est un indice de cytotoxicité des extraits de plantes ; il est évalué par la mesure spectrophotométrique du pourcentage de libération d'hémoglobine intracellulaire des globules rouges humains suite à une lyse membranaire. Le degré de cytotoxicité *in vitro* de l'activité hémolytique est évalué comme suit : 0 à 9 % : non toxique ; 10 à 49 % : légèrement toxique ; 50 à 89 % : toxique ; et 90 à 100 % : hautement toxique (**Pagano et Faggio, 2015**).

Les résultats de cette étude ont démontré que l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* ne présentait aucune toxicité sur les globules rouges aux concentrations testées (0,5-2,5 mg/mL), par rapport au contrôle négatif. Cependant, à une concentration de 5 mg/mL, un pourcentage d'hémolyse de $16,87 \pm 0,73$ % a été observé, indiquant un léger degré de toxicité. Comparativement, des tests de cytotoxicité réalisés sur une lignée cellulaire issue de reins embryonnaires humains HEK 293T (Wang et al., 2013) et sur des épidermes humains reconstitués (Maack et Pegard, 2016), ont corroboré l'absence de toxicité des extraits de Peuplier.

III.4. Évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* a été évaluée par les tests anti-radicalaires, DPPH et ABTS, et par l'activité de blanchissement de la β -carotène. Les résultats du pourcentage d'inhibition ainsi que les IC_{50} sont représentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Activités anti-radicalaires et activité de blanchissement de la β -carotène de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra*, de l'acide caféique et du trolox.

	Activité anti-DPPH•		Activité anti-ABTS• ⁺		Activité de blanchissement de la β -carotène	
	% (100 μ g/mL)	IC_{50} (μ g/mL)	% (100 μ g/mL)	IC_{50} (μ g/mL)	% (100 μ g/mL)	IC_{50} (μ g/mL)
Extrait éthanolique	$96,31 \pm 3,42$	$42,39 \pm 2,42$	$62,16 \pm 2,20$	$36,21 \pm 2,16$	$85,27 \pm 1,79$	$17,82 \pm 1,51$
Acide caféique	$92,01 \pm 2,22$	$3,86 \pm 0,20^{***}$	–	–	$64,83 \pm 5,91^*$	$42,87 \pm 8,47^*$
Trolox	–	–	% (20 μ g/mL)	IC_{50} (μ g/mL)	–	–
			$79,31 \pm 5,67^{##}$	$8,30 \pm 0,24^{###}$		

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 3). Les différences sont considérées significatives pour * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparant le % d'inhibition et les IC_{50} de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* avec l'acide caféique et # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ en comparant le % d'inhibition et les IC_{50} de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* avec le trolox.

III.4.1. Test du DPPH

Le DPPH est un radical synthétique utilisé afin de mesurer la capacité d'un extrait de plante à le réduire via le transfert des atomes d'hydrogène ($\text{DPPH}\cdot - \text{DPPH}_2^+$). Le potentiel inhibiteur du DPPH par l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* a été évalué et comparé à celui de l'acide caféique, choisi comme molécule standard. Les résultats démontrent un fort pouvoir inhibiteur de l'extrait avec un pourcentage de $96,31 \pm 3,42\%$ à $100\ \mu\text{g/mL}$, comparable à celui de l'acide caféique qui est de $92,01 \pm 2,22\%$ à la même concentration (Tableau IV). Ce taux est supérieur à celui obtenu par **Debbache et al. (2014)** et par **Merghache et al. (2016)** pour des extraits hydro-alcooliques de la même plante. Cependant, l' IC_{50} obtenu pour l'extrait éthanolique ($42,39 \pm 2,42\ \mu\text{g/mL}$) est significativement plus élevé ($p < 0,001$) que celle de l'acide caféique ($3,86 \pm 0,20\ \mu\text{g/mL}$). Néanmoins, son potentiel antioxydant est supérieur à celui rapporté par **Merghache et al. (2016)** qui présente une IC_{50} de $220\ \mu\text{g/mL}$.

III.4.2. Test de l'ABTS

Tout comme le DPPH, l'ABTS est un radical synthétique utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes, en réduisant par transfert d'électrons l' $\text{ABTS}\cdot^+$ à la forme non radicalaire. Le taux d'inhibition obtenu pour l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* est de $62,16 \pm 2,20\%$, significativement inférieur ($p < 0,01$) à celui du Trolox, choisi comme molécule standard ($79,31 \pm 5,67\%$). De la même manière, l' IC_{50} obtenu pour l'extrait éthanolique ($36,21 \pm 2,16\ \mu\text{g/mL}$) est significativement plus élevé ($p < 0,001$) que celle du trolox ($8,30 \pm 0,24\ \mu\text{g/mL}$) (Tableau IV). Ces résultats montrent un pouvoir réducteur meilleur que l'extrait obtenu par **Debbache et al. (2014)** enregistrant des taux d'inhibition ne dépassant pas les 50% , ainsi que ceux enregistrés par la méthode d'extraction au CO_2 supercritique sur le bois et l'écorce ($4,70 \pm 0,70\%$ et $1,43 \pm 0,09\%$, respectivement) (**Ostolski et al., 2021**). Ceci reflète l'influence de la méthode d'extraction sur le potentiel antioxydant des extraits de plantes.

III.4.3. Test de blanchissement de la β -carotène

La β -carotène a été utilisée afin de déterminer le potentiel préventif de la peroxydation lipidique par l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* en mesurant l'inhibition de la formation des

hydro-péroxydes conjugués (ROO[•]) résultant de l'oxydation de l'acide linoléique, qui attaquent la β -carotène, induisant ainsi la disparition de sa couleur orange, mesurée à 470 nm. Les résultats obtenus dans cette étude démontrent que l'extrait éthanolique de *P. nigra* est très efficace avec un pourcentage d'inhibition de $85,27 \pm 1,79$ % (IC₅₀: $17,82 \pm 1,51$ µg/mL), surpassant ainsi celui de l'acide caféique ($p < 0,05$), choisi comme molécule standard ($64,83 \pm 5,91$ %) (IC₅₀: $42,87 \pm 8,47$ µg/mL) (Tableau IV). De ce fait, ces résultats rapportent pour la première fois l'effet de l'extrait de bourgeons floraux de cette plante contre le blanchissement de la β -carotène. Ils s'avèrent plus pertinents que ceux déjà rapportés par **Todaro et al. (2017)** qui ont obtenu des taux d'inhibition ne dépassant pas les 50 % sur l'extrait de bois de *Populus nigra*, mais sont en accord avec des études antérieures ($86,13 \pm 1,20$ %) sur *Populus tremula* (**Krimat et al., 2014**).

Les résultats des IC₅₀ révèlent que l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* présente une activité antioxydante plus marquée contre la peroxydation lipidique. Il est suivi d'un potentiel inhibiteur significatif envers le radical ABTS^{•+}, suivi de l'inhibition du radical DPPH[•]. Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'inhibition du radical ABTS^{•+} par l'extrait est plus spécifique que celle du DPPH[•]. En effet, l'ABTS^{•+} agit par transfert d'un atome d'hydrogène, entraînant une réduction directe du radical en une forme stable. Alors que l'interaction avec le DPPH implique une compétition entre deux mécanismes, le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert séquentiel d'électrons par perte de proton, ce qui rend l'interaction entre le DPPH[•] et l'extrait moins directe et plus complexe (**Tang et al., 2007**).

Les composés phénoliques sont considérés comme de puissants antioxydants dotés de multiples mécanismes d'action, capable de piéger les espèces radicalaires. Différentes investigations ont rapporté la relation entre la structure des différents composés phénoliques et leur potentiel antioxydant. Ainsi, l'activité réductrice des acides phénoliques varierait en fonction du nombre de groupes hydroxyles présents. Pour les flavonoïdes, la présence de la structure ortho-dihydroxy sur l'anneau B, la double liaison 2,3 avec une fonction 4-oxo dans l'anneau C, ainsi que les groupes 3- et 5-hydroxyle avec la fonction 4-oxo dans les anneaux A et C serait l'exigence structurelle essentielle pour un piégeage efficace des radicaux libres (**Dai et Mumper, 2010**).

III.5. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* a été évaluée par les tests anti-hémolytique, anti-monoxyle d'azote, antitrypsine, anti-cyclooxygénase et anti-lipoxygénase. Les résultats du pourcentage d'inhibition ainsi que les IC₅₀ sont représentés dans les tableaux V et VI.

Tableau V : Activités anti-hémolytique, anti-NO• et antitrypsine de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* et de l'acide caféique.

	Activité anti-hémolytique		Activité anti-NO•		Activité antitrypsine	
	% (100 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	% (100 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	% (100 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrait éthanologique	53,00 ± 1,29	13,17 ± 1,61	51,99 ± 0,11	82,67 ± 0,94	52,88 ± 0,60	94,41 ± 2,32
Acide caféique	12,53 ± 1,87***	> 100 ***	58,27 ± 5,25	83,56 ± 4,02	50,94 ± 2,06	24,53 ± 1,26***

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3). Les différences sont considérées significatives pour **p* < 0,05 ; ***p* < 0,01 ; ****p* < 0,001 en comparant le % d'inhibition et les IC₅₀ de l'extrait éthanologique des bourgeons floraux de *P. nigra* avec l'acide caféique.

III.5.1. Activité anti-hémolytique

L'étude *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanologique des bourgeons floraux de *P. nigra* par inhibition de l'hémolyse des hématies induite par une solution hypotonique révèle un fort pouvoir anti-hémolytique de l'extrait, avec un pourcentage d'inhibition de 53,00 ± 1,29 % (IC₅₀ : 13,17 ± 1,61 µg/mL), significativement plus élevée (*p* < 0,001) que celui de l'acide caféique estimé à 12,53 ± 1,87 % (IC₅₀ > 100 µg/mL) (Tableau V).

Le test d'hémolyse des globules rouges a été choisi pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de plante *in vitro* en raison de la facilité d'isolement des érythrocytes, de la simplicité de la méthode et de la forte similitude entre leurs membranes et celle des lysosomes (Anosike et al., 2012). Les lysosomes sont des organelles intracellulaires contenant des enzymes hydrolytiques, telles que les protéases, les nucléases, les lipases, et les phosphatases (Zhang et al., 2021). Au cours de la réaction inflammatoire, les lysosomes libèrent ces enzymes et d'autres médiateurs de l'inflammation afin d'éliminer les pathogènes, ce qui mène à l'amplification de l'inflammation (Simonaro, 2019). Par conséquent, la protection et la stabilisation de la membrane lysosomale est d'une grande importance, car cela entraînerait le blocage de la libération des enzymes lysosomales et minimiserait la lyse cellulaire. Plusieurs

études ont rapporté l'effet bénéfique des extraits de plantes sur la stabilisation de la membrane érythrocytaire (Heydari et al., 2019). Tout comme les médicaments anti-inflammatoires, les extraits de plante pourraient agir en se liant à la membrane des cellules érythrocytaires et en induisant une modification subséquente des charges à la surface membranaire empêchant ainsi l'interaction physique avec les agents d'agrégation (Oyedapo et al., 2010). Les composés phénoliques pourraient également se lier aux composants membranaires et contribuer à la régulation du volume d'eau intracellulaire par le contrôle des mouvements des ions sodiques et potassiques à travers les canaux protéiques (Umapathy et al., 2010).

III.5.2. Activité anti-monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO•) est un médiateur pro-inflammatoire impliqué dans plusieurs événements physiologiques, sa production étant essentielle pour la défense de l'organisme. Cependant, sa surproduction peut entraîner des lésions tissulaires et l'activation de médiateurs pro-inflammatoires associés à l'inflammation aiguë et chronique. Par conséquent, les inhibiteurs de cette molécule pourraient être bénéfiques pour le traitement d'une réponse inflammatoire exaspérée.

Afin d'évaluer le potentiel inhibiteur du monoxyde d'azote de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*, plusieurs concentrations ont été utilisées et les résultats obtenus ont montré un potentiel modéré comparable à celui obtenu pour l'acide caféique (Tableau V). En effet, une inhibition d'environ 50 % a été obtenue à 100 µg/ml, pour l'extrait de *P. nigra* (IC₅₀: 82,67 ± 0,94 µg/mL), semblable à celle de l'acide caféique (IC₅₀: 83,56 ± 4,02 µg/mL) (Tableau V). Ces résultats s'avèrent plus efficaces que ceux obtenus par la méthode de macération rapportés par Debbache et al. (2014) sur l'extrait éthanolique de la même plante, avec des taux d'inhibition qui ne dépassent pas les 20 %. Ainsi, ces variations de l'activité anti-inflammatoire observées au sein de la même espèce peuvent être attribuées aux différences dans les méthodes d'extraction utilisées. Saifullah et al. (2020) ont démontré que ces méthodes peuvent avoir un impact significatif sur la teneur en composés phénoliques, influençant ainsi les différentes activités biologiques des extraits. Dans une autre étude de Jeong et Lee (2018), une forte inhibition de production d'oxyde nitrique par l'extrait de feuilles de *Populus deltoides* à une concentration de 25 µg/mL, a été observée sur des cellules RAW 264.7 stimulées par les LPS.

Les composés phénoliques sont connus pour leurs propriétés de piégeage des espèces radicalaires tel que le monoxyde d'azote. Toute fois, leur pouvoir anti-inflammatoire peut aussi

se manifester en agissant en tant que modulateur de la synthèse de ce dernier ou en bloquant l'expression de l'enzyme oxyde nitrique synthase. L'épigallocatechine gallate, par exemple, peut bloquer l'activation de NFκB, réduisant ainsi l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible et la production d'oxyde nitrique dans les macrophages (**Dini et Grumetto, 2022**). **Jeong et Lee (2018)** ont également démontré l'inhibition de l'expression de l'enzyme oxyde nitrique synthase par un extrait de *Populus deltoides*.

III.5.3. Activité antitrypsine

Dans la présente étude, le pourcentage d'inhibition de la trypsine par l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* est dose-dépendant et est estimé à $52,88 \pm 0,60$ % à une concentration de 100 µg/mL, comparable à celui de l'acide caféique qui est de $50,94 \pm 2,06$ %. Cependant, l'IC₅₀ enregistré pour l'extrait de plante ($94,41 \pm 2,32$ µg/mL) est significativement plus élevé ($p < 0,001$) que celle de l'acide caféique ($24,53 \pm 1,26$ µg/mL), démontrant une efficacité plus élevée (Tableau V).

Les neutrophiles sont une source de protéinases jouant un rôle important dans le développement de lésions tissulaires au cours des réactions inflammatoires. Les inhibiteurs de protéinases offrent une protection significative contre ces lésions. Une étude sur des extraits d'écorce et de feuille de *P. nigra* a rapporté une meilleure activité antitrypsine avec des IC₅₀ estimées à $35,8 \pm 0,1$ µg/mL et $46,5 \pm 0,3$ µg/mL pour l'écorce et les feuilles, respectivement (**Jedinak et al., 2010**). Plusieurs autres travaux réalisés sur les composés phénoliques ont rapporté un effet inhibiteur de ces derniers sur les protéases, notamment la trypsine (**Sergent et al., 2012** ; **Shahwar et al., 2012** ; **Martinez-Gonzalez et al., 2017** ; **Tan et al., 2019**). On suggère que la structure de ces molécules bioactives serait à l'origine de cette activité. En effet, la présence de groupes hydroxyles sur les polyphénols représente un avantage pour la liaison et la diminution de l'activité enzymatique (**Shahwar et al., 2012**). De plus, il a été rapporté que les flavonoïdes étaient des inhibiteurs plus puissants que les acides phénoliques en raison de la complexité de leur structure (**Martinez-Gonzalez et al., 2017**). **Tan et al. (2017)** ont observé une plus forte inhibition de l'activité des protéases par le flavonoïde myricétine que par les acides phénoliques tels que l'acide gallique, l'acide caféique, et l'acide sinapique. De la même manière, **Sergent et al. (2012)**, ont observé un effet inhibiteur plus élevé sur les protéases pour la quercétine et le kaempférol, par rapport à l'acide férulique.

III.5.4. Activité anti-lipoxygénase et anti-cyclooxygénase

L'implication des enzymes pro-inflammatoire, cyclooxygénase et lipoxygénase dans certaines pathologies inflammatoires est un fait avéré. C'est pour cela que l'inhibition de ces deux enzymes constitue une cible thérapeutique intéressante. Dans cette optique, l'activité inhibitrice de la COX et de la LOX de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* a été évaluée et les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau VI.

Tableau VI : Activités anti-cyclooxygénase et anti-lipoxygénase de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra*, de l'acide gallique et de l'indométacine.

	Activité anti-cyclooxygénase		Activité anti-lipoxygénase	
	% (250 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	% (100 µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrait éthanolique	53,88 ± 2,55	234,28 ± 6,51	52,80 ± 0,20	95,98 ± 0,54
Acide gallique	54,45 ± 1,61	121,44 ± 10,25***	–	–
Indométacine	–	–	95,11 ± 4,89###	28,57 ± 5,80###

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3). Les différences sont considérées significatives pour **p* < 0,05 ; ***p* < 0,01 ; ****p* < 0,001 en comparant le % d'inhibition et les IC₅₀ de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* avec l'acide gallique et #*p* < 0,05 ; ##*p* < 0,01 ; ###*p* < 0,001 en comparant le % d'inhibition et les IC₅₀ de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* avec l'indométacine.

Les résultats obtenus indiquent une inhibition dose-dépendante des deux enzymes pro-inflammatoires par l'extrait éthanolique, avec des pourcentages d'inhibition similaires, estimés à 53,88 ± 2,55 % et 52,80 ± 0,20 % pour la COX et la LOX, respectivement. De plus, l'inhibition de la COX par l'acide gallique, qui est estimée à 54,45 ± 1,61 %, est comparable à celle obtenue avec l'extrait. Cependant, le potentiel inhibiteur de la LOX par l'indométacine s'est avéré plus élevé que celui de l'extrait de plante avec un pourcentage de 95,11 ± 4,89 %. Concernant les IC₅₀, les deux standards, acide gallique et indométacine ont enregistré des valeurs significativement moins élevées (*p* < 0,001) (IC₅₀ : 121,44 ± 10,25 µg/mL ; IC₅₀ : 28,57 ± 5,80 µg/mL) que celles de l'extrait de plante (IC₅₀ : 234,28 ± 6,51 µg/mL ; IC₅₀ : 95,98 ± 0,54 µg/mL) pour la COX et la LOX, respectivement (Tableau VI).

Ces résultats sont en accord avec les résultats de **Poblocka-Olech et al. (2019)** qui ont rapportés un rôle protecteur potentiel de l'extrait de bourgeons de *P. nigra* contre l'inflammation sur les cellules HGF-1 par une diminution de l'expression de la COX. Dans une étude *in vivo*, une forte inhibition de la COX dans les homogénats de foie de souris traitées par l'extrait éthanolique des bourgeons de *P. nigra* a également été observée (**Peng et al., 2018**).

Au niveau cellulaire, les enzymes COX et LOX métabolisent l'acide arachidonique afin de générer des prostaglandines (PGs) et des leucotriènes (LTs), respectivement, impliqués dans la réaction inflammatoire. La capacité des polyphénols à réduire la libération d'acide arachidonique, de prostaglandines et de leucotriènes est considérée comme l'un de leurs mécanismes anti-inflammatoires les plus importants. Leur action est principalement assurée par leur capacité à inhiber les enzymes cellulaires, telles que la phospholipase A2 (PLA2), la COX et la LOX (Yahfoufi et al., 2018). En effet, il a été démontré que la curcumine inhibait certaines enzymes pro-inflammatoires comme la COX chez la souris et la LOX dans les cellules endothéliales humaines MAPK (Gupta et al., 2011). De plus, dans une autre étude, les auteurs ont observé une répression de l'expression génétique de la COX par la quercétine dans les macrophages RAW 264.7 (De Stefano et al., 2007). En outre, il a été prouvé que l'ester phénéthylque de l'acide caféique, l'un des principaux composants de la propolis pouvait empêcher la libération de l'acide arachidonique de la membrane cellulaire et inhiber l'expression des enzymes LOX et COX (Pahlavani et al., 2020).

III.6. Évaluation de l'activité antibactérienne

Afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* sur la croissance de trois souches bactériennes, la méthode de microdilution en milieu liquide a été utilisée. L'extrait a inhibé la croissance de toutes les souches bactériennes testées, avec des valeurs de CMI₉₀ de 254,96 µg/mL, 312,0 µg/mL et 594,43 µg/mL pour *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*, respectivement, *E. coli* étant la plus sensible. En comparaison, l'antibiotique ampicilline a montré une inhibition plus élevée que l'extrait avec des valeurs de CMI₉₀ de 22 µg/mL, 35,85 µg/mL et 15,63 µg/mL pour *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*, respectivement. Nos résultats corroborent ceux rapportés par Merghache et al. (2016) qui ont révélé l'inhibition de la souche *S. aureus* avec un extrait méthanolique des bourgeons de *P. nigra*, avec une concentration de 295,4 µg/mL, mais sont beaucoup plus meilleurs que l'inhibition obtenue sur les souches *E. coli* et *P. aeruginosa*, avec des concentrations de 590,8 µg/mL et 1181,5 µg/mL, respectivement. D'autres recherches ont également rapportés des activités antibactériennes sur les mêmes souches avec un extrait éthanolique des bourgeons de *P. nigra* (Debbache et al., 2014 ; Boumghar et al., 2019).

Certains extraits de plantes riches en composés phénoliques possèdent des propriétés antibactériennes significatives (Dini et Grumetto, 2022). Plusieurs mécanismes d'action pourraient être exercés par ces métabolites contre les microorganismes. La principale cible de

ces composés naturels est la membrane bactérienne ; ils peuvent donc former des complexes irréversibles avec les protéines membranaires entraînant leur inactivation (Alibi et al., 2021). Ainsi, les tanins pourraient induire une inhibition des pompes ioniques bactériennes modifiant ainsi les caractéristiques de perméabilité membranaire (Pizzi, 2021). Il a également été rapporté que les acides phénoliques pouvaient diffuser à travers la membrane bactérienne et acidifier le cytoplasme, entraînant la mort cellulaire (Alibi et al., 2021). En outre, les phénols simples interagissent avec les groupes sulfhydryles des enzymes microbiennes, induisant ainsi leur inhibition (Aldulaimi, 2017).

III.7. Évaluation de l'activité cicatrisante

La peau est la première ligne de défense contre les agressions extérieures, elle est caractérisée par sa capacité à guérir après une blessure (Graham et al., 2019). Malgré l'impressionnante capacité de la peau à retrouver une partie de ses fonctions, sa régénération n'est pas parfaite, les blessures conduisent plutôt à des cicatrices dont les propriétés fonctionnelles sont inférieures à celles d'une peau saine (Pattnaik et al., 2023). Les traitements conventionnels des plaies sont souvent associés à des médicaments anti-inflammatoires et antimicrobiens ayant des effets secondaires (Cialdai et al., 2022). Les formulations à base de phyto-constituants peuvent offrir une alternative intéressante aux médicaments, principalement en raison de leur sécurité et de leur rentabilité, en plus de leurs propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes intrinsèques (Pattnaik et al., 2023).

III.7.1. Détermination de la contraction des plaies

L'activité cicatrisante de deux pommades préparées à base d'un extrait éthanolique de bourgeons floraux de *P. nigra* a été étudiée sur un modèle d'excision sur les rats, pendant 14 et 20 jours. La vaseline a été choisie comme excipient et le madecassol, l'une des pommades cicatrisantes les plus couramment utilisées a été choisie comme médicament de référence. Les plaies ont été évaluées par des observations visuelles et des photographies quotidiennes ont été prises afin de leur attribuer un score basé sur leur évolution en terme d'exsudat, érythème, œdème et formation de la croûte. Le diamètre de la zone cicatrisée a également été mesuré chaque jour pour chaque animal par le calcul de la contraction des plaies.

III.7.1.1. Observation macroscopique des plaies

La cicatrisation des plaies est un mécanisme complexe soutenu par plusieurs événements étroitement coordonnés afin de réparer efficacement les tissus endommagés (Wilkinson et

Hardman, 2020). Ce processus commence par l'étape d'homéostasie qui est caractérisée par l'arrêt de l'hémorragie facilité par la vasoconstriction et la formation d'un caillot de fibrine. En effet, au début de l'étude, les plaies présentaient un aspect homogène et comparable dans tous les groupes, accompagné d'un arrêt des saignements (Figure 26).

Cette étape est suivie des phases inflammatoires et prolifératives. La phase inflammatoire est caractérisée par la présence d'exsudat, d'érythème et d'œdème dans la zone de la plaie. Ces manifestations résultent d'une vasodilatation capillaire et d'une perméabilité accrue (**Leconte, 2013**). Au cours de la première semaine de traitement, les groupes témoins ont présenté un foyer inflammatoire notable au niveau de la plaie, qui s'est avéré moins important chez les rats traités avec les pommades à base de *P. nigra*. A partir du 7^{ème} jour, une inhibition significative de l'érythème a été observée chez ces derniers par rapport aux rats des autres groupes. D'autre part, l'exsudat a diminué significativement chez les rats traités par le madécassol ainsi que par les pommades 10 et 20 %.

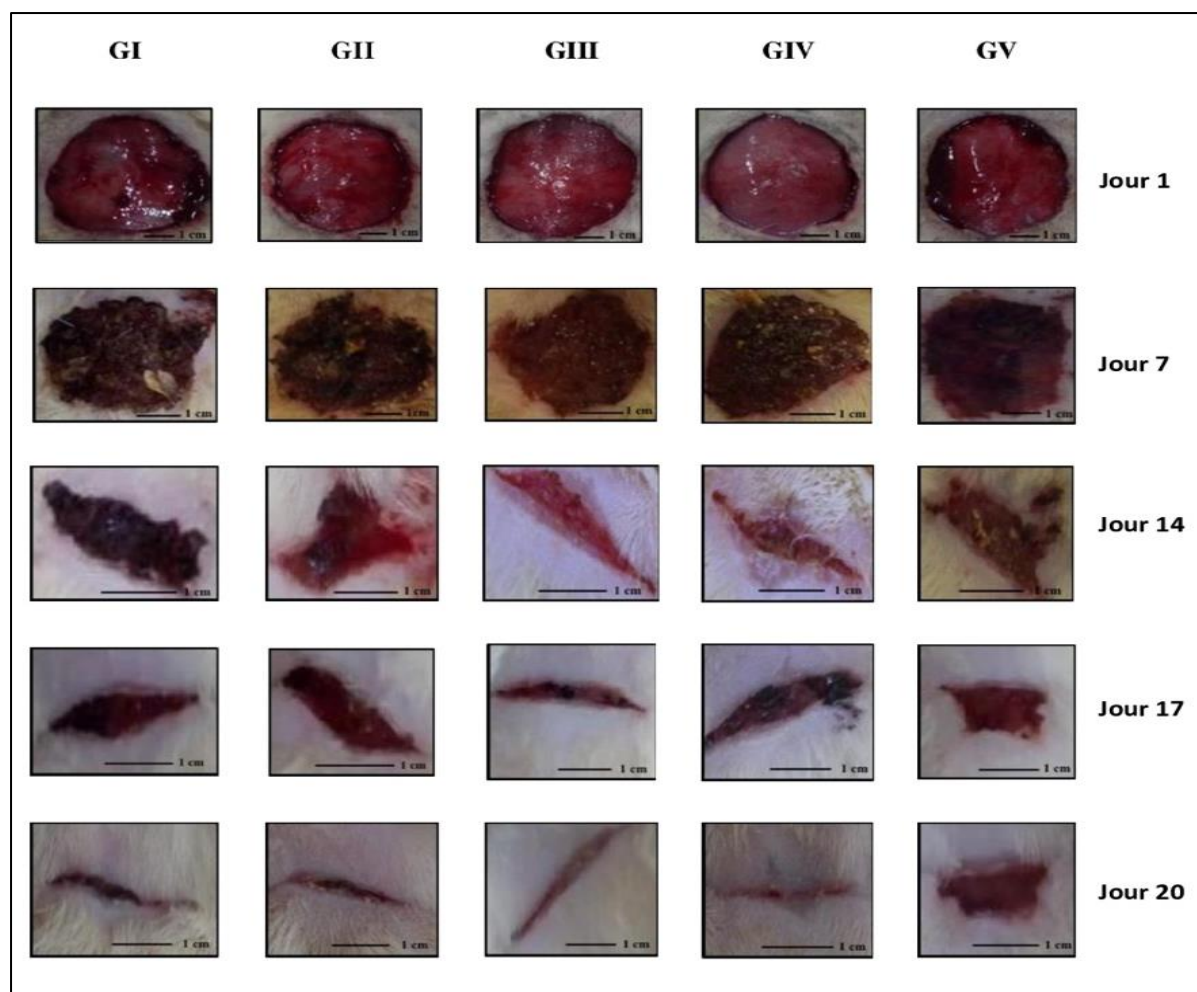


Figure 26 : Evolution de la surface des plaies des différents groupes de rats aux jours 1, 7, 14, 17, et 20. **GI :** groupe témoin avec une excision non traitée, **II :** groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **III :** groupe traité avec la pommade 10 %, **IV :** groupe traité avec la pommade 20 %, **V :** groupe traité avec l'excipient.

La phase proliférative suit et chevauche la phase inflammatoire, elle conduit à la formation du tissu de granulation, à la réépithélialisation et à la rétraction de la plaie (**Cañedo-Dorantes et Cañedo-Ayala, 2019**). Effectivement, à partir du 7^{ème} jour, une croûte granuleuse et épaisse a commencé à se former sur les plaies des rats des groupes témoins. En revanche, les rats des groupes traités avec les pommades à base de *P. nigra* présentaient une croûte plus fine, ce qui indique que le processus de cicatrisation était nettement plus avancé dans ces derniers groupes. Au 14^{ème} jour, les croûtes ont commencé à se détacher des plaies, entraînant la formation d'une zone rouge irritée chez les rats des groupes témoins et d'une zone rose chez les rats des groupes traités avec le madécassol et les pommades 10 et 20 %.

Une fois le processus de cicatrisation terminé, la phase de remodelage s'ensuit et peut durer plusieurs années. Cette phase se caractérise par la formation de collagène mature, qui sert à renforcer le tissu cicatriciel.

III.7.1.2. Pourcentage de contraction des plaies

À l'instar des observations macroscopiques de l'évolution des blessures des rats des différents groupes, le pourcentage de contraction des plaies s'est révélé être homogène chez tous les groupes au début de l'étude (Figure 27). Cependant, les résultats obtenus indiquent une augmentation notable de la contraction des plaies des rats traités avec les pommades à base de *P. nigra* du 14^{ème} au 20^{ème} jour, comparé au groupe témoin et au groupe traité avec l'excipient. Au 14^{ème} jour, les pourcentages de contraction des plaies des groupes témoin, traités avec la pommade de référence, madécassol et traité avec l'excipient étaient de 80,53, 82,10 et 78,95 %, respectivement. Ces résultats sont significativement ($p < 0,001$) inférieurs aux pourcentages de contraction des plaies des groupes traités avec les pommades 10 et 20 % qui ont enregistré des taux de 90,49 et 90,13 %, respectivement. Au 20^{ème} jour, aucune différence significative n'a été observée dans les pourcentages de contraction des plaies des groupes traités avec les pommades à base de *P. nigra* 10 et 20 % (97,37 % et 97,28 %, respectivement). Ces résultats sont significativement ($p < 0,05$; $p < 0,01$) supérieurs aux pourcentages de contraction des plaies chez les rats des groupes témoin et traité avec l'excipient, qui ont enregistré des pourcentages de cicatrisation de 91,59 et 90,16 %, respectivement. Au 14^{ème} jour, le traitement avec les pommades à base de *P. nigra* 10 et 20 % a induit une contraction des plaies de 90,49 et 90,13 %, respectivement, des taux significativement plus élevés ($p < 0,001$) que ceux observés avec les groupes témoin (80,53 %), traité avec la pommade de référence, madécassol

(82,10 %) et traité avec l'excipient (78,95 %). Au 20^{ème} jour, aucune différence significative n'a été observée dans les pourcentages de contraction des plaies des groupes traités avec les pommades à base de *P. nigra* 10 et 20 % (97,37 % et 97,28 %, respectivement). Ces résultats sont significativement ($p < 0,05$; $p < 0,01$) supérieurs aux pourcentages de contraction des plaies des rats des groupes témoin (91,59 %) et traité avec l'excipient (90,16 %).

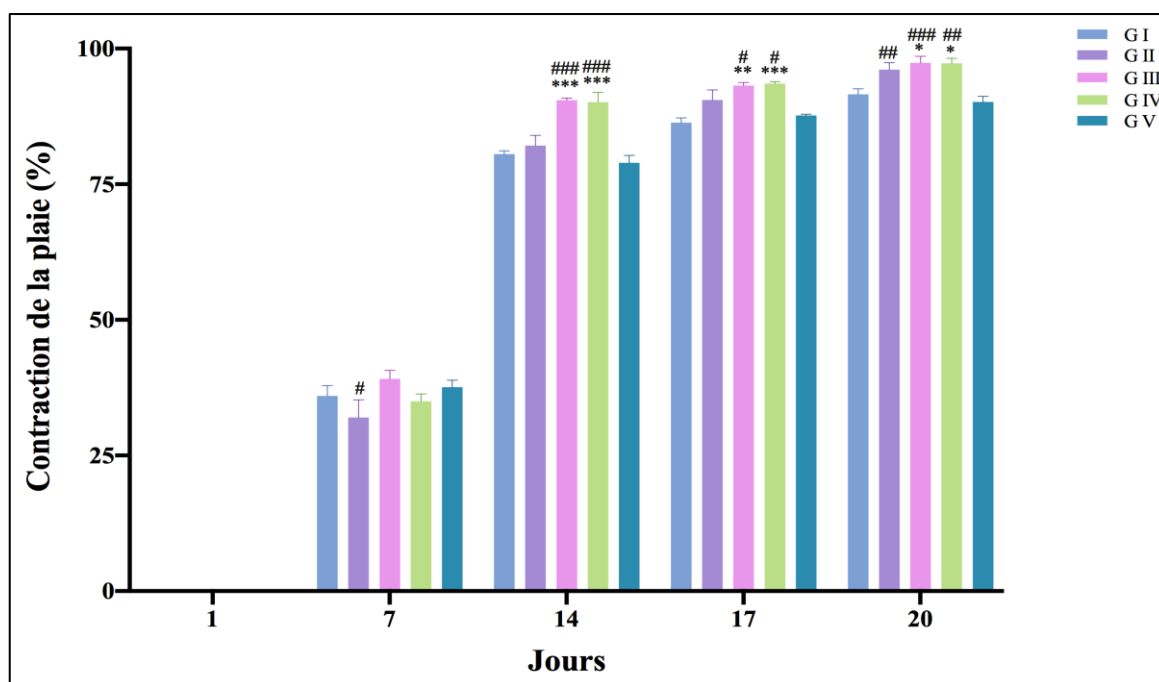


Figure 27 : Pourcentage de contraction des plaies des groupes de rats aux jours 1, 7, 14, 17 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ($n = 5$). Les différences sont considérées significatives pour $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ en comparant le % de contraction des plaies des différents groupes au groupe I et $#p < 0,05$, $##p < 0,01$, $###p < 0,001$ en comparant le % de contraction des plaies des différents groupes au groupe V. **GI** : groupe témoin avec une excision non traitée, **GII** : groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **GIII** : groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV** : groupe traité avec la pommade 20 %, **GV** : groupe traité avec l'excipient.

Diverses études ont démontré la capacité des plantes médicinales, en général, et des bourgeons de Peuplier, en particulier, à faciliter la cicatrisation des plaies. En effet, on a observé que l'utilisation de l'huile essentielle de *Populus alba* favorisait la cicatrisation des plaies de manière plus rapide dans un modèle de brûlure chez les rats (**Belkhodja et al., 2020**). De plus, **Lipinski et al. (2012)** ont rapporté un effet positif de l'extrait de feuilles de *Casearia sylvestris*, une plante appartenant à la famille des Salicacées, sur l'aspect macroscopique des lésions cutanées chez les bovins. En outre, d'autres travaux ont également rapporté les propriétés cicatrisantes des composés phénoliques. Ainsi, dans une étude, **Gokhale et al. (2019)** ont

élaboré un gel à base de quercétine qui s'est révélé efficace pour réduire les signes inflammatoires, notamment l'érythème et l'œdème. Il a également été observé que l'administration d'un hydrogel supplémenté en rutine réduisait la surface de la plaie dans un modèle d'excision chez les rats, stimulant ainsi la régénération des tissus (Almeida et al., 2012).

Dans une autre étude, l'utilisation de membranes de chitosane enrichies de vanilline pour le traitement d'incisions cutanées chez des rats diabétiques a entraîné une réduction notable de la taille de la plaie et une augmentation du taux de réépithélialisation (de Aragão Tavares et al., 2019).

III.7.2. Etude biochimique

Afin de mieux comprendre les mécanismes de cicatrisation induits par les deux pommades à base de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*, les tissus cutanés ont tous été soigneusement prélevés afin de réaliser des études complémentaires permettant d'évaluer leur potentiel de cicatrisation et leurs effets anti-inflammatoires et antioxydants.

III.7.2.1. Estimation des taux d'hydroxyproline et d'hexosamine

Au cours du processus de cicatrisation, à la fin de la phase inflammatoire et au début de la phase proliférative, les premiers fibroblastes apparaissent sur le site de la plaie et synthétisent les composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène et les glycosaminoglycanes, qui jouent un rôle essentiel dans le rétablissement de l'intégrité de la peau (Bainbridge, 2013).

Le collagène est une protéine présente dans la plupart des tissus de l'organisme et constitue le principal composant de la matrice extracellulaire. Il joue un rôle important dans une série de processus physiologiques assurant la résilience et l'intégrité structurelle de l'organisme. Il est composé de trois chaînes polypeptidiques caractérisées par des séquences répétitives de trois acides aminés, dont la 4-hydroxyproline (Macovescu et al., 2016). Cette dernière est un acide aminé synthétisé à partir de l'hydroxylation post-traductionnelle de la proline par la prolyl hydroxylase. L'hydroxyproline étant présente dans très peu de protéines, à l'exception du collagène, la détermination de sa teneur a été utilisée comme marqueur pour quantifier les niveaux de collagène (Lin et Kuan, 2010).

Les hexosamines jouent un rôle dans la stabilité du collagène en conférant résilience et viscoélasticité à la matrice extracellulaire (Vallet et al., 2021). Ce sont des glucides aminés formés par la substitution d'un groupe hydroxyle -OH d'un sucre hexose par un groupe amine

-NH₂. Après acétylation, elle se condense avec l'acide uronique pour former des glycosaminoglycanes (GAGs) qui sont de majeurs composants de la matrice extracellulaire (**Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022**).

Les teneurs en hydroxyproline et hexosamine des tissus cutanés des rats des différents groupes expérimentaux ont été évaluées au 14^{ème} et 20^{ème} jour, comme présentés dans les figures 28 et 29, respectivement.

Après une période de traitement de 14 jours, aucune différence significative n'a été observée entre le groupe I et les autres groupes, à l'exception du groupe III traité avec la pommade à 10% qui a enregistré un taux d'hydroxyproline de $29,43 \pm 1,53$ µg/mg de tissu, une valeur significativement plus élevée ($p < 0,001$) que celle du groupe I ($24,46 \pm 0,73$ µg/mg de tissu). Cependant, après une période de traitement de 20 jours, les taux d'hydroxyproline obtenus dans les tissus cutanés des rats des groupes II, III, IV et V traités, respectivement avec le médicament de référence (madécassol), les pommades à 10 et 20 % et l'excipient ($24,31 \pm 1,11$; $28,05 \pm 1,20$; $25,29 \pm 1,17$ et $24,65 \pm 0,31$ µg/mg de tissu) étaient significativement supérieurs ($p < 0,001$) à ceux du groupe I ($16,81 \pm 1,07$ µg/mg de tissu) (Figure 28).

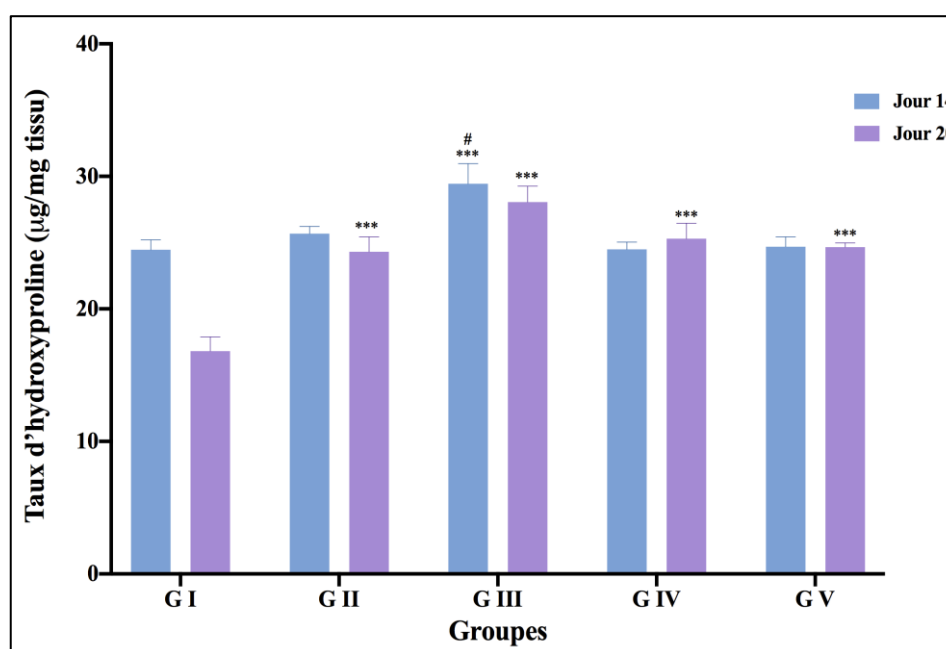


Figure 28 : Taux d'hydroxyproline des tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 5). Les différences sont considérées significatives pour $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ en comparant le taux d'hydroxyproline des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe I et $\#p < 0,05$; $\##p < 0,01$; $\###p < 0,001$ en comparant le taux d'hydroxyproline des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe V.

GI : groupe témoin avec une excision non traitée, **GI** : groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **GIII** : groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV** : groupe traité avec la pommade 20 %, **GV** : groupe traité avec l'excipient.

Les résultats présentés dans la figure 29 indiquent que l'application topique des pommades 10 et 20 % a induit une augmentation significative ($p < 0,001$) de la concentration d'hexosamine au 14^{ème} jour avec des valeurs respectives de $34,34 \pm 1,75$ et $35,85 \pm 0,41$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu comparé au groupe témoin qui n'a reçu aucun traitement ($25,51 \pm 1,34$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu). D'autre part, aucune différence significative des taux d'hexosamine n'a été trouvée en comparant les groupes II et V ($26,33 \pm 1,35$ et $22,31 \pm 1,01$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu, respectivement) au groupe témoin. De plus, après 20 jours de traitement, les niveaux d'hexosamine ont diminué dans tous les groupes mais cette réduction s'est révélée significative ($p < 0,05$) dans le groupe I ($14,11 \pm 0,88$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) et le groupe III ($20,18 \pm 1,21$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu). D'autre part, une différence significative a également été observée en comparant les groupes III ($p < 0,01$) et IV ($p < 0,05$) au groupe V traité avec l'excipient ($13,15 \pm 0,82$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu).

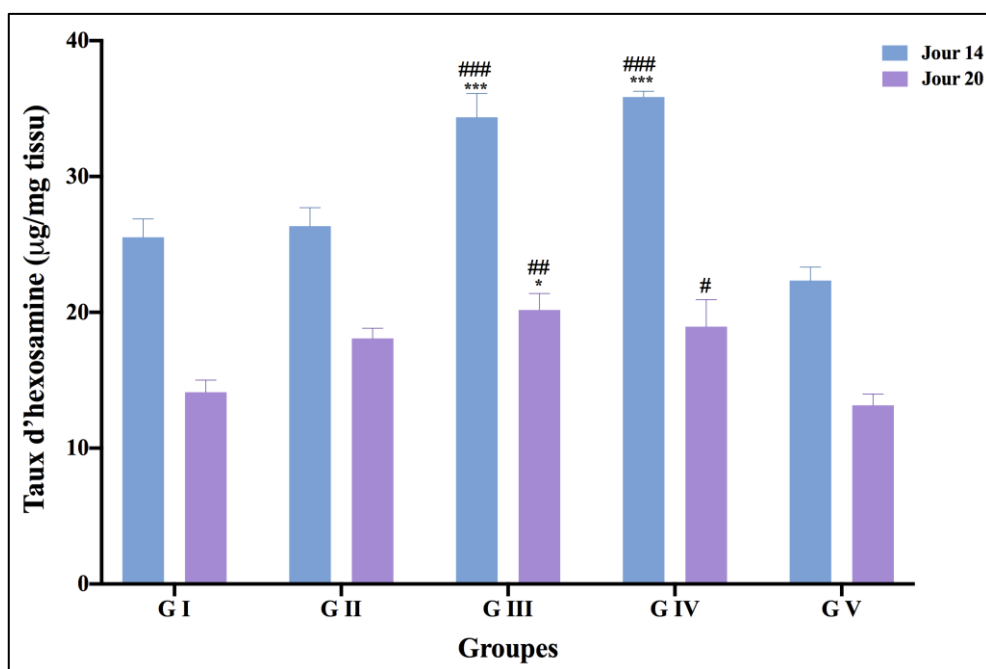


Figure 29 : Taux d'hexosamine des tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ($n = 5$). Les différences sont considérées significatives pour $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ en comparant le taux d'hexosamine des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe I et $\#p < 0,05$; $\##p < 0,01$; $\###p < 0,001$ en comparant le taux d'hexosamine des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe V.

GI : groupe témoin avec une excision non traitée, **II** : groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **GIII** : groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV** : groupe traité avec la pommade 20 %, **GV** : groupe traité avec l'excipient.

Les niveaux élevés d'hydroxyproline et d'hexosamine retrouvés après 14 jours de traitement chez les groupes traités avec les pommades à base de *P. nigra* indique la régénération des tissus et la stimulation de la cicatrisation (**Bodas et Shinde, 2021**). D'autre part, une baisse des

niveaux d'hydroxyproline et d'hexosamine après 20 jours est directement associée au renouvellement du collagène, étant donné que le métabolisme de ce dernier dépend des niveaux de ces molécules (**Pattnaik et al., 2023**).

L'utilisation de composés naturels dérivés de plantes médicinales est devenue un domaine d'intérêt majeur dans le développement de thérapies alternatives sûres et efficaces pour le traitement des plaies cutanées. Certains rapports indiquent que ces produits naturels ont la capacité de stimuler la synthèse du collagène, accélérant ainsi le processus de cicatrisation (**Pattnaik et al., 2023**). En effet, de nombreuses plantes de la famille des Salicacées ont prouvé leur pouvoir cicatrisant. Dans une étude *in vivo*, une pommade à base d'un extrait de fleurs de *Salix aegyptiaca* à une concentration de 25 % a démontré une augmentation des taux de dépôt de fibres de collagène dans un modèle d'excision chez les rats (**Rafiei et al., 2024**). De plus, les effets de la trémulacine et de la trémuloidine, deux composés isolés à partir d'un extrait éthanolique de feuilles de *Salix chaenomeloides*, ont été évalués sur la sécrétion de collagénases dans des fibroblastes dermiques humains traitées au TNF- α . Les résultats ont indiqué une réduction et même une suppression de la sécrétion des collagénases (**Ahn et al., 2024**). Ainsi, l'activité stimulante du collagène par l'extrait de *P. nigra* est probablement associée à sa composition en polyphénols, en particulier l'acide cinnamique et l'acide férulique (**Dudonné et al., 2011**). En effet, une étude *in vivo* a démontré qu'une pommade à base d'acide cinnamique accélérerait la contraction des plaies et augmentait les taux d'hydroxyproline dans les tissus cutanés de lapins ayant subi des excisions (**Naghavi et al., 2021**). De plus, il a été établi que l'administration d'acide férulique régule l'activité de l'hydroxyproline dans un modèle de colite ulcéreuse induite par l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS) chez les rats (**Sadar et al., 2016**).

III.7.2.2. Estimation de l'activité de la myéloperoxydase

La phase inflammatoire est essentielle au processus de cicatrisation, car elle prévient l'infection. En effet, les neutrophiles développent des granules contenant un ensemble spécifique d'agents antimicrobiens, notamment des protéases et des espèces réactives de l'oxygène. Ces derniers sont générés par l'action de la myéloperoxydase, qui convertit le H₂O₂ en HOCl. Cependant, une inflammation excessive entravera la transition vers la phase proliférative, conduisant ainsi à l'émergence d'une plaie chronique et à un retard dans la cicatrisation. Par conséquent, le pouvoir anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des

bourgeons floraux de *P. nigra* a été testé par son activité anti-MPO qui a contribué au processus de cicatrisation des plaies *in vivo* dans les tissus cutanés, comme le montrent les résultats (Figure 30).

Après une période de traitement de 14 jours, l'activité de la MPO enregistrée dans le groupe II, traité avec une pommade de référence, madecassol, ($279,80 \pm 13,21$ U/mg de protéines) était la plus élevée, surpassant celle des autres groupes. D'autre part, l'activité de la MPO a diminué de manière significative ($p < 0,001$ et $p < 0,05$) dans les groupes III et IV ($52,24 \pm 18,82$ et $60,22 \pm 2,67$ U/mg de protéines, respectivement) par rapport aux groupes I ($127,35 \pm 19,00$ U/mg de protéines) et V ($177,41 \pm 25,59$ U/mg de protéines). Cependant, après 20 jours de traitement, une baisse drastique de l'activité de la MPO a été observée pour tous les groupes, en particulier les groupes III et IV ($2,21 \pm 1,01$ et $2,13 \pm 0,75$ U/mg de protéines, respectivement), par rapport au groupe II ($6,62 \pm 2,06$ U/mg de protéines) et au groupe I ($14,32 \pm 3,21$ U/mg de protéines).

Le madecassol est une pommade couramment utilisée dans le traitement des plaies. Bien que ce médicament intègre un extrait de *Centella asiatica*, une plante largement étudiée pour ses propriétés anti-inflammatoires, il a démontré une capacité d'inhibition relativement faible de la MPO. Il est donc probable que le mécanisme d'action anti-inflammatoire du madecassol ne repose pas sur l'inhibition de cette enzyme mais pourrait avoir d'autres cibles moléculaires (Patel et al., 2016).

Un certain nombre d'études ont démontré que les plantes médicinales et les substances dérivées des plantes possèdent une série d'avantages thérapeutiques, tels que des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires (Zulkefli et al., 2023). Il a été établi que l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de *Casearia sylvestris*, une plante appartenant à la famille des Salicacées, a réduit significativement l'activité de la MPO dans un modèle murin d'œdème aigu de l'oreille (Heymanns et al., 2021). De la même manière, Sadar et al. (2016) ont rapporté une diminution de l'activité de la MPO suite à l'administration d'acide férulique dans un modèle de colite ulcéreuse induite par le TNBS chez les rats. En outre, il a été démontré qu'un hydrogel préparé à base de naringine possédait une puissante activité anti-inflammatoire *in vivo*, comme en témoigne la réduction des niveaux de MPO dans un modèle d'excision chez le rat (Alsakhawy et al., 2022).

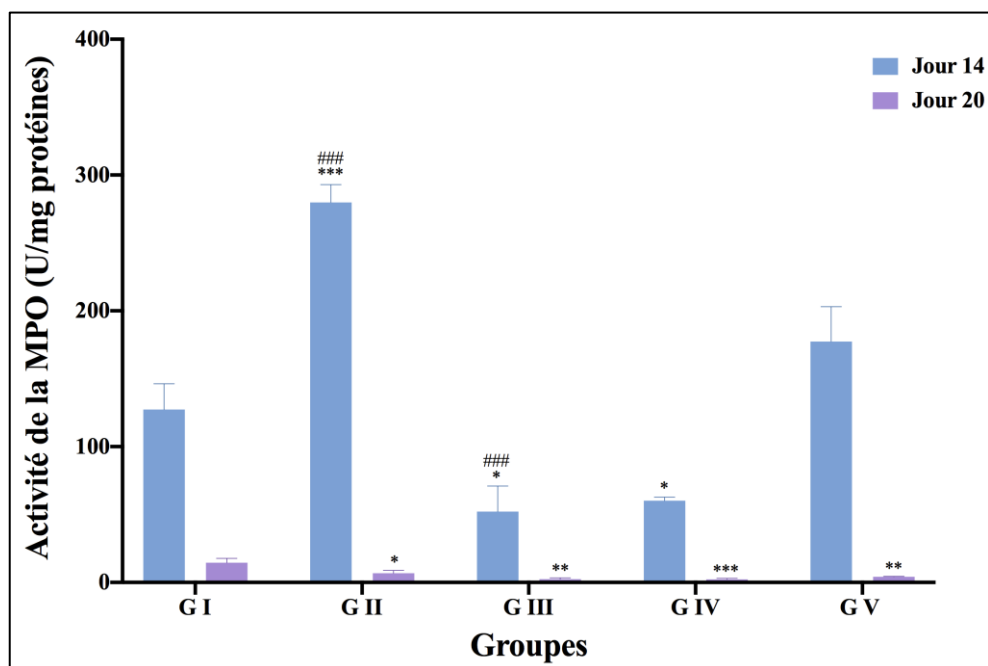


Figure 30 : Activité de la myéloperoxydase dans les tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 5). Les différences sont considérées significatives pour $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ en comparant l'activité de la MPO des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe I et $^{\#}p < 0,05$; $^{\#\#}p < 0,01$; $^{\#\#\#}p < 0,001$ en comparant l'activité de la MPO des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe V.

GI : groupe témoin avec une excision non traitée, **GII :** groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **GIII :** groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV :** groupe traité avec la pommade 20 %, **GV :** groupe traité avec l'excipient.

III.7.2.3. Estimation de l'activité des enzymes antioxydantes, superoxyde dismutase et catalase

Les espèces réactives de l'oxygène produites par les macrophages et les neutrophiles pendant la phase inflammatoire de la cicatrisation jouent un rôle essentiel dans l'élimination des pathogènes. Bien que leur production soit bénéfique contre l'invasion microbienne du site de la plaie, à des niveaux excessifs, elle induit une cytotoxicité et exacerbe l'inflammation, compromettant ainsi le processus de cicatrisation (**Raziyeva et al., 2021**). Leur élimination par les enzymes antioxydantes endogènes SOD et CAT est essentielle pour une activité cicatrisante optimale.

La superoxyde dismutase et la catalase sont des enzymes qui font partie intégrante du système de défense antioxydant endogène de l'organisme, servant à protéger les cellules contre les effets

néfastes des radicaux libres (Dzialo et al., 2016). La catalase permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène et la SOD est une oxydoréductase qui inactive l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Une activité accrue des enzymes antioxydants, SOD et CAT, a été observée dans les tissus cicatrisés des groupes traités par les pommades à base de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* par rapport aux autres groupes, soulignant l'amélioration de l'état redox dans ces tissus (Figure 31 et 32).

Les résultats illustrés dans la figure 31 indiquent une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'activité de la catalase après 14 jours de traitement au niveau des tissus cutanés des groupes II, III, IV, et V ($0,074 \pm 0,003$; $0,101 \pm 0,001$; $0,086 \pm 0,003$; $0,082 \pm 0,003$ U/mg de protéines) comparé au groupe I ($0,021 \pm 0,001$ U/mg de protéines). De plus, l'activité de la catalase enregistrée dans les tissus cutanés des rats traités avec la pommade à base de *P. nigra* à 10 % est significativement supérieure ($p < 0,01$) à celle observée dans les tissus cutanés des rats traités avec l'excipient.

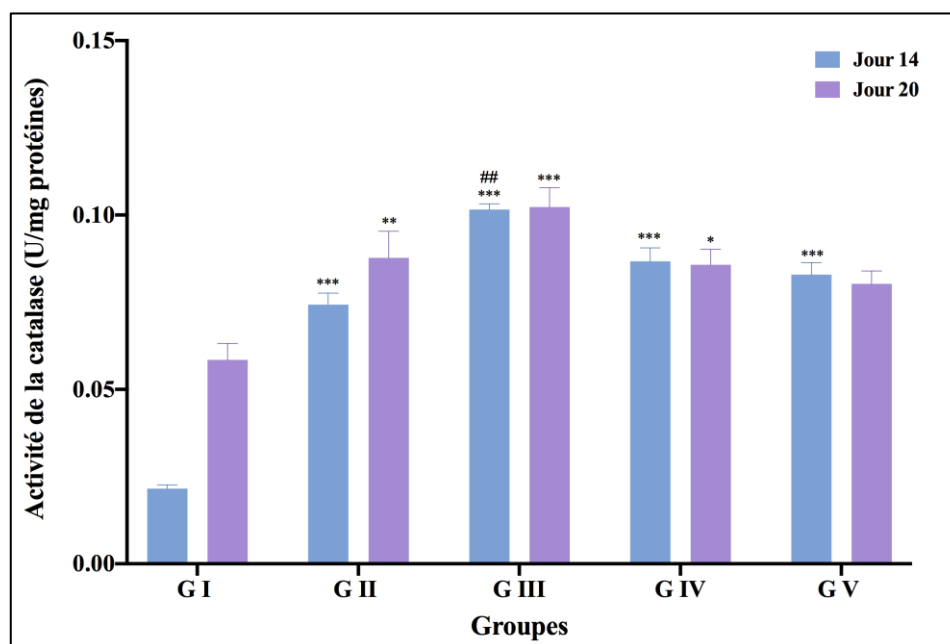


Figure 31 : Activité de la catalase des tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ($n = 5$). Les différences sont considérées significatives pour $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ en comparant l'activité de la CAT des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe I et $\#p < 0,05$, $\##p < 0,01$, $\###p < 0,001$ en comparant l'activité de la CAT des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe V.

GI : groupe témoin avec une excision non traitée, **GII** : groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **GIII** : groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV** : groupe traité avec la pommade 20 %, **GV** : groupe traité avec l'excipient.

De même, après 20 jours de traitement, le niveau de l'activité catalase dans le groupe I ($0,058 \pm 0,004$ U/mg de protéines) s'est avéré faible, contrairement à ceux observés dans les groupes II, III et IV qui sont de $0,087 \pm 0,007$; $0,102 \pm 0,005$; $0,085 \pm 0,004$ U/mg de protéines, respectivement, illustrant une augmentation significative à $p < 0,01$, $p < 0,001$ et $p < 0,05$, respectivement, en particulier dans le groupe III. En outre, aucune différence significative n'a été enregistrée entre le groupe I et le groupe V ($0,080 \pm 0,003$ U/mg de protéines).

En ce qui concerne la superoxyde dismutase, les résultats présentés dans la figure 32 indiquent qu'après une période de traitement de 14 jours, l'activité la plus faible de cette enzyme a été observée dans les tissus cutanés des groupes I et V avec des valeurs respectives de $180,27 \pm 6,40$ et $166,01 \pm 17,43$ U/mg de protéines. Le traitement avec la pommade de référence ainsi qu'avec les pommades à base de *P. nigra*, 10 et 20 % a induit une augmentation significative ($p < 0,05$ et $p < 0,01$) de l'activité de la SOD dans les tissus cutanés des rats des groupes II, III, et IV avec des valeurs égales à $348,55 \pm 51,13$; $330,41 \pm 31,47$ et $347,09 \pm 37,91$ U/mg de protéines, respectivement, par rapport aux groupes I et V.

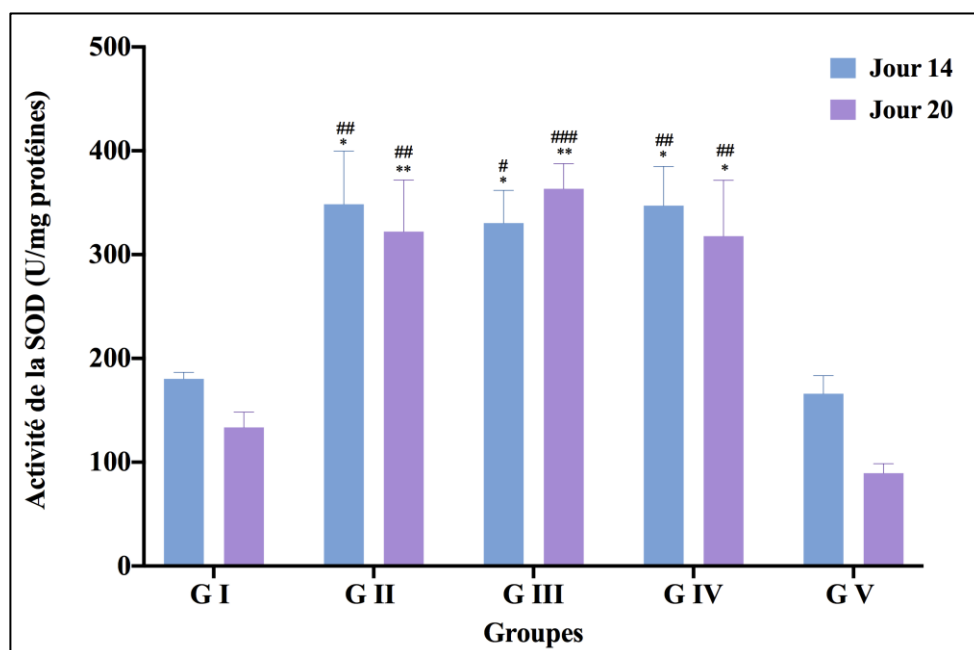


Figure 32 : Activité de la superoxyde dismutase dans les tissus cutanés des rats des différents groupes aux jours 14 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 5). Les différences sont considérées significatives pour $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ en comparant l'activité de la SOD des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe I et $\#p < 0,05$; $##p < 0,01$; $###p < 0,001$ en comparant l'activité de la SOD des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe V.

GI : groupe témoin avec une excision non traitée, **GI** : groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **GIII** : groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV** : groupe traité avec la pommade 20 %, **GV** : groupe traité avec l'excipient.

De la même manière, après 20 jours de traitement, une augmentation significative ($p < 0,01$ et $p < 0,05$) de l'activité de la SOD a été observée dans les tissus cutanés des rats des groupes II, III, et IV avec des valeurs respectives égales à $322,16 \pm 49,63$; $363,34 \pm 24,37$ et $317,82 \pm 53,83$ U/mg de protéines, par rapport au groupe I. En outre, aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes I et V.

Les polyphénols ont été étudiés pour leurs effets bénéfiques sur la modulation de l'activité des enzymes antioxydantes et sur la régulation de l'expression des gènes liés à la réponse antioxydante. En effet, des études ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Casearia sylvestris*, une plante de la famille des Salicacées, augmentait significativement l'activité de la SOD et de la CAT dans un modèle de colite ulcéreuse induite par le TNBS chez les rats (Arunachalam et al., 2024). Par ailleurs, Sadar et al. (2016) ont rapporté également une augmentation de l'activité de la SOD suite à l'administration d'acide férulique à des rats atteints de colite ulcéreuse induite par le TNBS.

Concernant l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes, des études ont démontré que les polyphénols peuvent agir en tant qu'inducteurs de ces enzymes. Ce mécanisme est souvent associé à l'activation de voies de signalisation intracellulaires, notamment celle du facteur de transcription nucléaire erythroid 2-like 2 (Nrf2), qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la réponse cellulaire au stress oxydatif. Effectivement, il a été établi que les polyphénols favorisent l'activation de Nrf2 en réponse à des conditions de stress oxydatif (Liu et al., 2019).

III.7.3. Estimation de l'activité des transaminases dans le sérum sanguin

L'effet de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* sur l'activité des transaminases, ALT et AST, a été étudié, étant donné que toute altération des niveaux basaux de ces paramètres est considérée comme un indicateur de toxicité sur le foie. Dans des conditions physiologiques, l'ALT et l'AST permettent la génération du pyruvate et de l'oxaloacétate, respectivement, (Kobayashi et al., 2020) qui sont essentiels pour le cycle de Krebs (Gasmi et al., 2021). En plus, elles participent à la synthèse du glutamate, un acide aminé glucoformateur et le neurotransmetteur le plus important du système nerveux central (Schousboe et al., 2013). L'ALT est une enzyme spécifique du foie, retrouvée dans le cytosol des hépatocytes et libérée dans la circulation sanguine lors de la lyse des hépatocytes. En

revanche, l'AST se trouve dans les mitochondries des hépatocytes, des reins, du cerveau, du muscle cardiaque et squelettique. En cas de lésions structurelles du foie, ces deux enzymes sont libérées en excès dans la circulation sanguine (Kobayashi et al., 2020).

Comme le montre la figure 33, les valeurs des enzymes hépatiques ALT et AST dans les groupes I et V, 14 jours après la formation des plaies étaient de $66,12 \pm 3,52$; $76,00 \pm 4,98$ et $108,50 \pm 8,53$; $101,25 \pm 4,93$ UI/L, respectivement. Ces valeurs n'ont pas changé de manière significative après 20 jours ($68,75 \pm 2,50$; $76,83 \pm 3,24$ et $104,91 \pm 5,01$; $115,83 \pm 9,76$ UI/L, respectivement). De même, aucune modification des niveaux de transaminases n'a été enregistrée après l'application topique des différentes pommades au cours des 14 et 20 jours.

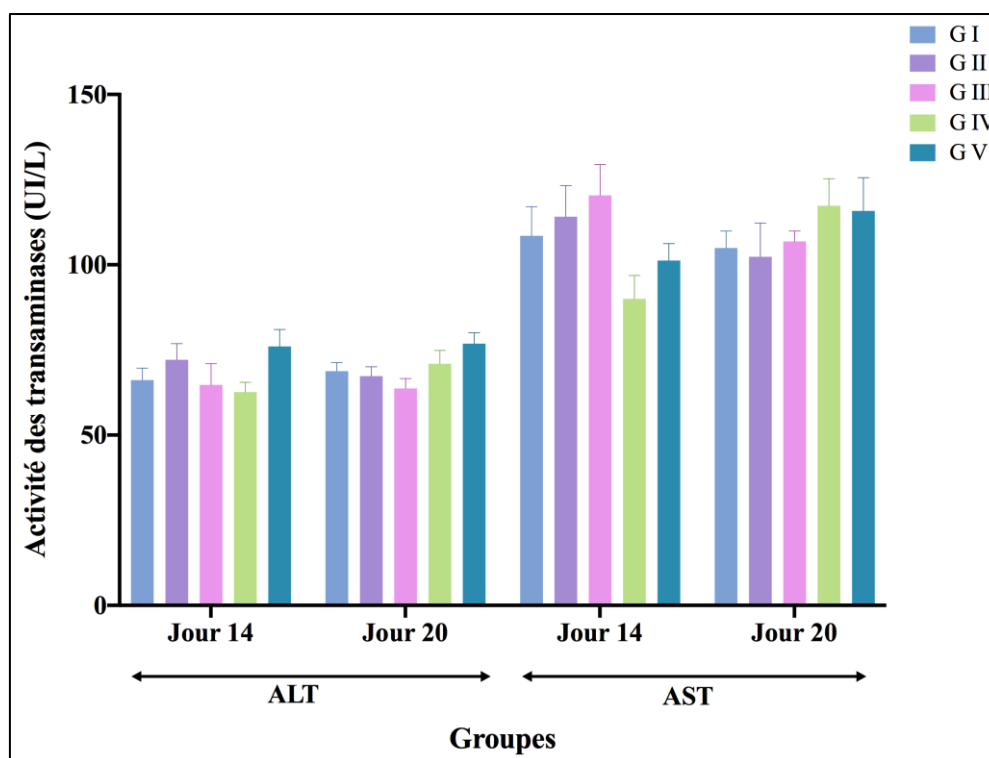


Figure 33 : Activité des transaminases dans les tissus cutanés des différents groupes de rats aux jours 14 et 20. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ($n = 5$). Les différences sont considérées significatives pour $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ en comparant l'activité des transaminases des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe I et $^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$, $^{\#\#\#}p < 0,001$ en comparant l'activité des transaminases des tissus cutanés des rats des différents groupes au groupe V. **GI** : groupe témoin avec une excision non traitée, **GI** : groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **GIII** : groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV** : groupe traité avec la pommade 20 %, **GV** : groupe traité avec l'excipient.

Nos résultats corroborent celles de **Saqib et al. (2021)**, ne révélant aucune hépato-toxicité associée à l'administration de l'extrait éthanolique de *Populus ciliata*, conformément aux valeurs d'ALT et d'AST, qui sont restées inchangées dans le modèle expérimental de toxicité chronique chez le rat. Cependant, certaines espèces végétales, malgré leurs propriétés thérapeutiques, sont reconnues pour leurs effets toxiques, en particulier sur le foie, en raison de leur composition phytochimique.

III.7.4. Analyse histologique

III.7.4.1. Analyse histologique des tissus hépatiques

Afin de confirmer les résultats de l'activité des transaminases, une analyse histologique des tissus hépatiques des rats des différents groupes expérimentaux a été réalisée, en utilisant la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (Figure 34).

Les examens histologiques du foie des rats du groupe I, qui n'avaient reçu aucun traitement, ont montré une architecture tissulaire normale. En effet, le parenchyme hépatique était organisé en lobules sans séparation visible, avec un espace porte à chaque sommet. Les lobules étaient centrés par une veine centrolobulaire et les hépatocytes étaient séparés les uns des autres par des sinusoides tapissées de cellules endothéliales et de cellules de Kupffer, situées entre les espaces portes et la veine centrolobulaire.

De la même manière, l'analyse histologique des tissus hépatiques des rats des groupes II, III, et IV a révélé une structure hépatique normale, montrant des hépatocytes disposés autour de la veine centrale et des noyaux disposés au milieu des cellules, traduisant la fonctionnalité de celles-ci. De plus aucune dilatation sinusoidale ou de saignements n'a été observé et aucun foyer inflammatoire n'était présent, ce qui signifie l'absence de lésions hépatiques.

Concernant les tissus hépatiques des rats du groupe V, l'examen histologique n'a révélé aucune altération morphologique du foie des rats traités par l'excipient. Il n'y avait donc aucun signe de nécrose ou de dilatation de la veine centrale ou des sinusoides.

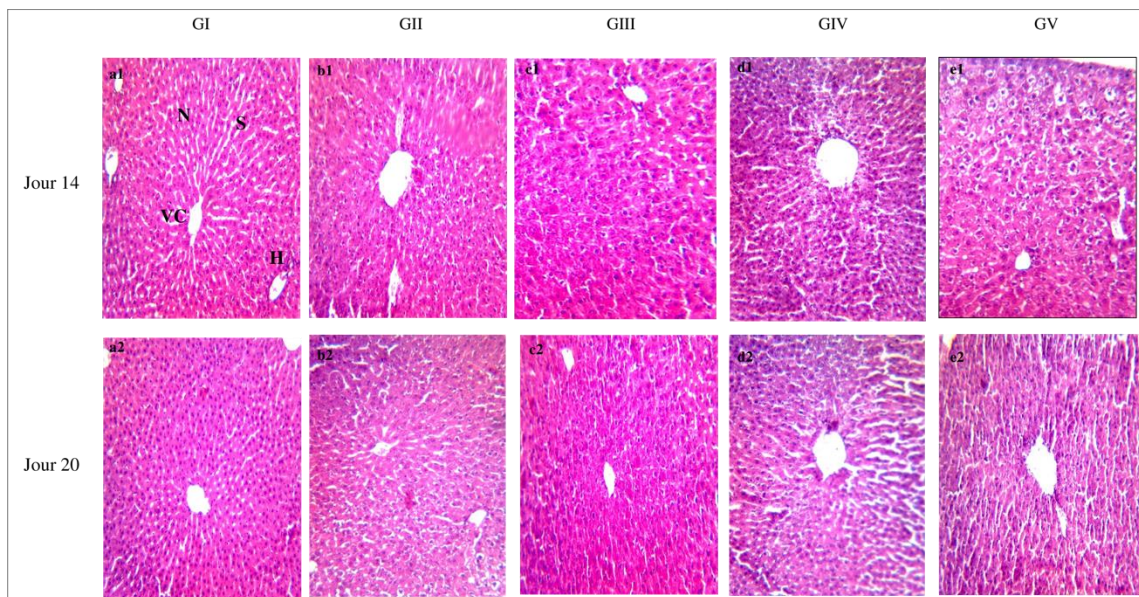


Figure 34 : Coupes histologiques des tissus hépatiques colorées à l'hématoxyline-éosine aux jours 14 (a1-e1) et 20 (a2-e2) après l'excision. H : Hépatocyte, N : Noyau, S : Sinusoïde, VC : Veine centrolobulaire. Grossissement $\times 400$.

GI : groupe témoin avec une excision non traitée, **GII :** groupe traité avec une pommade de référence (madecassol), **GIII :** groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV :** groupe traité avec la pommade 20 %, **GV :** groupe traité avec l'excipient.

En conclusion, les résultats de l'activité des transaminases sont consolidés par ceux de l'étude histologique, qui démontrent que le traitement des plaies avec les deux pommades à base de *P. nigra* n'a entraîné aucune altération de la structure du parenchyme hépatique. En effet, aucun signe d'inflammation ou de nécrose n'a été observé sur le foie, indiquant ainsi la non-toxicité de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra*. De plus, aucun décès ou signe de toxicité, comme des tremblements, une perte de poids ou une diarrhée, n'a été observé chez les animaux. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Debbache et al. (2013)**, qui ont étudié la toxicité aiguë de l'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra in vivo* sur des souris albinos. Néanmoins, il est à noter que la durée et la voie du traitement sont différentes.

III.7.4.2. Analyse histologique des tissus cutanés

L'analyse microscopique des échantillons de tissus prélevés sur la peau des rats des différents groupes est présentée dans la figure 35.

L'étude histologique des tissus cutanés des rats a permis de confirmer les résultats des observations macroscopiques de l'évolution des blessures et du pourcentage de contraction des plaies des rats.

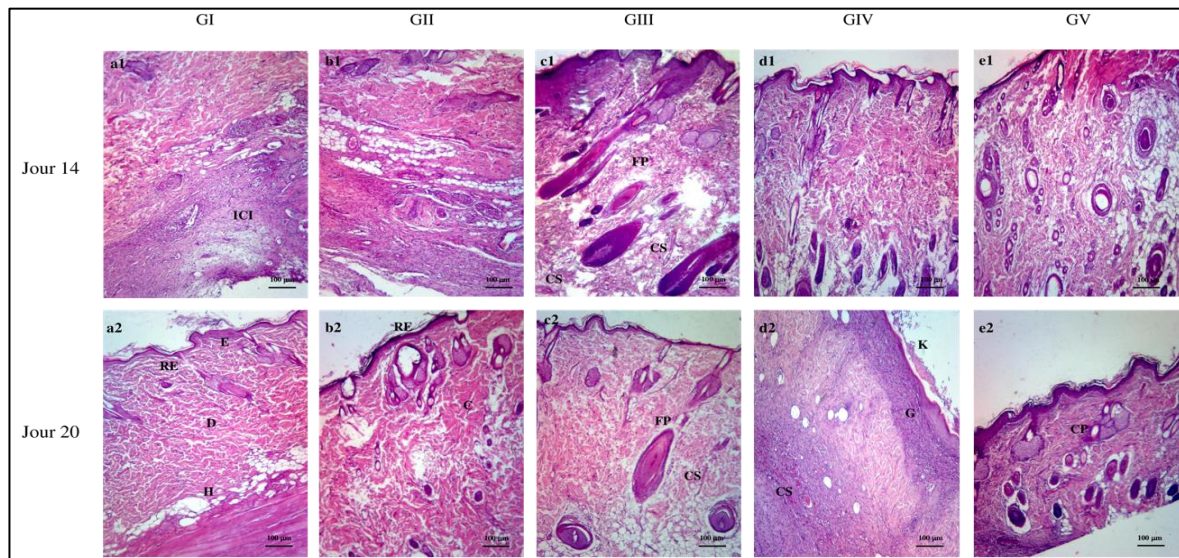


Figure 35 : Coupes histologiques des tissus cutanés colorées à l'hématoxyline-éosine aux jours 14 (a1-e1) et 20 (a2-e2) après l'excision. E: épiderme, D: derme, H: hypoderme, RE: ré-épithélialisation, ICI: infiltration de cellules inflammatoires, C: collagène, CS: capillaire sanguin, FP: follicule pileux, K: kératinisation, G: tissu de granulation, CP: corpuscule pacinien). Grossissement $\times 400$.

GI : groupe témoin avec une excision non traitée, **GII :** groupe traité avec une pommade de référence (madécassol), **GIII :** groupe traité avec la pommade 10 %, **GIV :** groupe traité avec la pommade 20 %, **GV :** groupe traité avec l'excipient.

Après une période de traitement de 14 jours, les tissus cutanés des rats des groupe I et V présentaient un indicateur majeur de l'inflammation, à savoir l'infiltration de cellules inflammatoires. De plus, les tissus de ces groupes étaient caractérisés par une réépithélialisation incomplète (Figure 35a1, e1), entraînant la formation d'un nouvel épithélium plus fin que celui observé dans les autres groupes après 20 jours (Figure 35a2, e2).

Après 14 jours de traitement, l'analyse des coupes histologiques des tissus cutanés des animaux du groupe II, traités avec la pommade de référence (madécassol) a révélé une désorganisation de l'architecture normale de la peau, désignée principalement par une couche dermique incomplète, en plus d'une infiltration de neutrophiles comme signe précoce d'une inflammation (Figure 35a1, e1). Cependant, après une période de traitement de 20 jours, un grand nombre de follicules pileux et d'artérioles a été observé, indiquant le début du processus de néo-angiogenèse.

D'autre part, la couche dermique des tissus cutanés des rats des groupes III et IV, traités respectivement avec les pommades 10 et 20 % présentait une morphologie régulière avec une

prolifération fibroblastique et vasculaire (Figure 35c2, d2), ainsi que la présence de follicules pileux avec un infiltrat de cellules inflammatoires minime.

Il convient de mentionner que la régénération du collagène a été observé sous formes de filaments dans tous les groupes, en particulier au 20^{ème} jour dans les tissus cutanés des rats des groupes traités avec la pommade de référence et les pommades à base de *P. nigra* comparé au groupe I (Figure 35b2, c2, d2).

Selon les résultats obtenus dans cette étude, une réépithélialisation a été constatée chez les rats traités avec les pommades à base de *P. nigra* 10 et 20 %. Ce phénomène peut être attribué à la formation de capillaires néo-synthétisés, lesquels assurent l'apport de nutriments et d'oxygène, indispensables à la division cellulaire active des fibroblastes, facilitant ainsi la régénération du tissu perdu. En effet, le tissu granuleux est constitué de capillaires néoformés dérivant de la paroi des vaisseaux intacts, ainsi que du collagène et de l'élastine, lesquels sont synthétisés par les fibroblastes (**Rodrigues et al., 2019**).

Dans l'étude faite sur l'extrait de *Terminalia chebula* (**Li et al., 2011**), les auteurs suggèrent que ce sont les tanins qui favorisent l'angiogenèse et stimulent les fibroblastes. Ces derniers se différencient en myofibroblastes qui, en se contractant, contribuent à la fermeture des plaies chez les groupes traités avec l'extrait éthanolique de *P. nigra*.

Il est important de rappeler que les fibroblastes jouent un rôle essentiel dans la cicatrisation normale des plaies, en participant à des processus clés, tels que la dissolution du caillot de sang, la création d'une nouvelle matrice extracellulaire (MEC) et de structures de collagène pour soutenir les autres cellules associées à une cicatrisation efficace, ainsi que la contraction de la plaie. Cette matrice complexe soutient et régule la migration et l'activité des fibroblastes, tout en servant de support et de signal pour l'angiogenèse, la génération de tissu de granulation et l'épithélialisation (**Bainbridge, 2013**).

Conclusion et perspectives

Les travaux de recherche entrepris au cours de cette étude ont permis de mettre en lumière le potentiel cicatrisant *in vivo* d'une pommade à base de bourgeons floraux de *Populus nigra*, composée d'une combinaison d'un extrait éthanolique et d'un excellent excipient pour l'application topique, la vaseline.

Nos expériences ont établi que la concentration de 10 % est optimale. Cette concentration a favorisé une contraction significative de la plaie (97,37 %), ainsi qu'une réduction des symptômes associés à l'inflammation, une réépithélialisation, une prolifération fibroblastique et vasculaire, et une régénération des fibres de collagène. Par ailleurs, les analyses biochimiques des tissus des rats traités avec cette pommade ont montré une augmentation de la synthèse de l'hydroxyproline et de l'hexosamine, contribuant ainsi à une cicatrisation rapide des plaies chez ces animaux.

L'efficacité thérapeutique de la pommade peut être en grande partie expliquée par sa forte activité antioxydante, qui se manifeste par une augmentation des activités enzymatiques de la catalase et de la superoxyde dismutase dans les tissus cutanés des rats. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans la défense antioxydante, car elles contribuent à la dégradation des espèces réactives de l'oxygène, à limiter les dommages cellulaires et à réduire l'intensité de l'inflammation, favorisant ainsi un environnement propice à la cicatrisation.

L'inhibition de la myéloperoxydase dans les tissus cutanés des rats par l'application de la pommade est un indicateur de la réduction de l'inflammation. L'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra* dans les tissus de peaux lésées était confirmé par les propriétés anti-COX, anti-LOX et anti-NO•. Ces mécanismes d'action combinés favorisent une réduction significative des médiateurs inflammatoires, contribuant ainsi à atténuer l'inflammation au niveau des tissus cutanés.

Le potentiel thérapeutique de cette pommade peut également être attribué à l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique, observée *in vitro*. En effet, cet extrait a montré une inhibition de la croissance des trois souches bactériennes testées à savoir *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*, qui sont couramment associées aux infections des plaies.

L'analyse HPLC-MS a révélée la présence de divers composés bioactifs, tels que les acides cinnamique, férulique et *p*-coumarique, ainsi que la rutine, la myricétine et l'esculine, dont les propriétés pharmacologiques contribuent sans aucun doute à l'efficacité de la pommade formulée à partir de l'extrait éthanolique des bourgeons floraux de *P. nigra*.

Les résultats obtenus au cours de la présente étude fournissent des preuves scientifiques de l'utilisation traditionnelle de *P. nigra* dans le processus de cicatrisation. En effet, les attributs pharmacologiques identifiés dans cette recherche permettent de considérer la pommade élaborée à base d'extrait de bourgeons floraux de *P. nigra* comme un nouveau médicament thérapeutique efficace contre l'inflammation tout en améliorant la cicatrisation de la peau. Cette avancée ouvre ainsi la voie à des perspectives intéressantes, notamment :

- Etude de l'activité cicatrisante de cette pommade formulée à base de bourgeons floraux de *P. nigra* en reprenant ce modèle d'excision chez les rats, où les plaies seraient intentionnellement contaminées avec les souches testées dans le cadre de cette étude pour mieux conclure quant à son pouvoir antibactérien *in vivo*. Par ailleurs, la reprise de ce test sur des rats diabétiques permettrait d'étudier l'efficacité de ce traitement sur les plaies chroniques.
- Utilisation de modèles alternatifs de cicatrisation, tels que les incisions et les brûlures, afin d'explorer d'autres mécanismes moléculaires.
- Réaliser des tests de culture cellulaire, notamment sur la prolifération, la différenciation et la migration des fibroblastes et des kératinocytes afin d'obtenir un aperçu détaillé des mécanismes des phytoconstituants de *P. nigra* dans la cicatrisation des plaies.
- Réaliser des essais cliniques afin d'évaluer l'efficacité de la pommade formulée à base de bourgeons floraux de *P. nigra*.
- Valoriser les bourgeons floraux de *P. nigra* en industrie pharmaceutique.

Références bibliographiques

- ❖ Abd Ghafar, S. Z., Mediani, A., Ramli, N. S., & Abas, F. (2018). Antioxidant, α -glucosidase, and nitric oxide inhibitory activities of *Phyllanthus acidus* and LC–MS/MS profile of the active extract. *Food Bioscience*, 25, 134-140.

- ❖ Afsar, T., Razak, S., Khan, M. R., Mawash, S., Almajwal, A., Shabir, M., & Haq, I. U. (2016). Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydaspica* R. Parker aerial parts. *BMC complementary and alternative medicine*, 16, 1-16.

- ❖ Ahad, B., Shahri, W., Rasool, H., Reshi, Z. A., Rasool, S., & Hussain, T. (2021). Medicinal plants and herbal drugs: An overview. *Medicinal and aromatic plants: healthcare and industrial applications*, 1-40.

- ❖ Ahmane, N., Atmani-Kilani, D., Chaher, N., Ayouni, K., Rahmani-Berboucha, M., Dacosta, G., Debbache-Benaïda, N., Richard, T., Atmani, D. (2019). Identification of bioactive compounds from *Fraxinus angustifolia* extracts with anti-NADH oxidase activity of bovine milk xanthine oxidoreductase. *Turkish Journal of Biology*. 43, 133–147.

- ❖ Ahn, S. Y., Kim, K. A., Lee, S., & Kim, K. H. (2024). Potential skin anti-aging effects of main phenolic compounds, tremulacin and tremuloidin from *Salix chaenomeloides* leaves on TNF- α -stimulated human dermal fibroblasts. *Chemico-Biological Interactions*, 402, 111192.

- ❖ Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 21(2), 143-152.

- ❖ Aldulaimi, O. A. (2017). General overview of phenolics from plant to laboratory, good antibacterials or not. *Pharmacognosy Reviews*, 11(22), 123.

- ❖ Alibi, S., Crespo, D., & Navas, J. (2021). Plant-derivatives small molecules with antibacterial activity. *Antibiotics*, 10(3), 231.

- ❖ Almeida, J. S., Benvegnú, D. M., Boufleur, N., Reckziegel, P., Barcelos, R. C. S., Coradini, K., ... & Beck, R. C. R. (2012). Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. *Drug development and industrial pharmacy*, 38(7), 792-799.
- ❖ Alsakhawy, M. A., Abdelmonsif, D. A., Haroun, M., & Sabra, S. A. (2022). Naringin-loaded Arabic gum/pectin hydrogel as a potential wound healing material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 222, 701-714.
- ❖ Amirrah, I. N., Lokanathan, Y., Zulkiflee, I., Wee, M. M. R., Motta, A., & Fauzi, M. B. (2022). A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: From biosynthesis to bioscaffold. *Biomedicines*, 10(9), 2307.
- ❖ Anosike, C. A., Obidoa, O., & Ezeanyika, L. U. (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 1-7.
- ❖ Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of biochemistry and biophysics*, 640, 47-52.
- ❖ Arunachalam, K., Matchado, M. S., Damazo, A. S., Cardoso, C. A. L., de Castro, T. L. A., Baranoski, A., ... & Oliveira, R. J. (2024). *Casearia sylvestris* var. lingua (Càmbyss.) Eichler leaves aqueous extract improves colon inflammation through mucogenic, antioxidant and anti-inflammatory actions in TNBS-induced IBD rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 118393.
- ❖ Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of wound care*, 22(8).
- ❖ Bandzerewicz, A., & Gadomska-Gajadur, A. (2022). Into the tissues: Extracellular matrix and its artificial substitutes: Cell signalling mechanisms. *Cells*, 11(5), 914.

- ❖ Belkhodja, H., Meddah, B., Touil, A. M. T., Bouhadi, D., & Belmimoun, A. (2020). Wound healing activity of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba* in a burn wound model in rats. *SAR Journal of Pathology and Microbiology*, 1, 1-9.
- ❖ Beloued A. (2001). Plantes médicinales d'Algérie. Office des Publications Universitaires, Alger, Algérie.
- ❖ Bensa, T., Tekkela, S., & Rognoni, E. (2023). Skin fibroblast functional heterogeneity in health and disease. *The Journal of Pathology*, 260(5), 609-620.
- ❖ Berhan Begashaw, B. B., Bharat Mishra, B. M., Asegedech Tsegaw, A. T., & Zewdneh Shewamene, Z. S. (2017). Methanol leaves extract *Hibiscus micranthus* Linn exhibited antibacterial and wound healing activities. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 17(1), 337.
- ❖ Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Bainsi, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols: From theory to practice. *Foods*, 10(11), 2595.
- ❖ Bessaguet, F., Seuve, É., & Desmoulière, A. (2022). La peau. *Actualités Pharmaceutiques*, 61(615), 57-61.
- ❖ Bélanger, A., Grenier, A., Simard, F., Gendreau, I., Pichette, A., Legault, J., & Pouliot, R. (2019). Dihydrochalcone derivatives from *Populus balsamifera* L. buds for the treatment of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 256.
- ❖ Bodas, K., & Shinde, V. (2021). Healing of wounds: a detailed review on models, biomarkers, biochemical and other wound assessment parameters. *International Journal of All Research Education Scientific Methods*, 9(3).
- ❖ Boumghar, N., Behidj, N., Ksouri, R. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, e18114.

- ❖ Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- ❖ Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21(7), 901.

- ❖ Bruch, G., & Wirth, E. H. (1936). Studies on poplar bud. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 25(8), 672-682.

- ❖ Brumberg, V., Astrelina, T., Malivanova, T., & Samoilov, A. (2021). Modern wound dressings: Hydrogel dressings. *Biomedicines*, 9(9), 1235.

- ❖ Campos, A. C., Groth, A. K., & Branco, A. B. (2008). Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(3), 281-288.

- ❖ Cañedo-Dorantes, L., & Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International journal of inflammation*, 2019(1), 3706315.

- ❖ Capasso, F., Gaginella, T. S., Grandolini, G., Izzo, A. A., Capasso, F., Gaginella, T. S., ... & Izzo, A. A. (2003). Therapeutic Overview of Galenical Preparations. *Phytotherapy: A Quick Reference to Herbal Medicine*, 45-60.

- ❖ Carvalho, M. T., Araújo-Filho, H. G., Barreto, A. S., Quintans-Júnior, L. J., Quintans, J. S., & Barreto, R. S. (2021). Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153636.

- ❖ Cedillo-Cortezano, M., Martinez-Cuevas, L. R., López, J. A. M., Barrera López, I. L., Escutia-Perez, S., & Petricevich, V. L. (2024). Use of medicinal plants in the process of wound healing: a literature review. *Pharmaceuticals*, 17(3), 303.

- ❖ Chabrier, J. Y. (2010). *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie*. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré.

- ❖ Che Sulaiman, I. S., Basri, M., Fard Masoumi, H. R., Chee, W. J., Ashari, S. E., & Ismail, M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, *11*, 1-11.

- ❖ Chen, L., & DiPietro, L. A. (2017). Toll-like receptor function in acute wounds. *Advances in wound care*, *6*(10), 344-355.

- ❖ Chen, Y., Tian, L., Yang, F., Tong, W., Jia, R., Zou, Y., ... & Yin, Z. (2019). Tannic acid accelerates cutaneous wound healing in rats via activation of the ERK 1/2 signaling pathways. *Advances in wound care*, *8*(7), 341-354.

- ❖ Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *38*(6), 421-464.

- ❖ Cialdai, F., Risaliti, C., & Monici, M. (2022). Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *10*, 958381.

- ❖ Cissell, D. D., Link, J. M., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2017). A modified hydroxyproline assay based on hydrochloric acid in Ehrlich's solution accurately measures tissue collagen content. *Tissue Engineering Part C: Methods*, *23*(4), 243-250.

- ❖ Clairborne, A. (1985). Assay of catalase. *Hand book of methods of oxygen free radical research*, 283-284.

- ❖ Clancy, D. M., Sullivan, G. P., Moran, H. B., Henry, C. M., Reeves, E. P., McElvaney, N. G., ... & Martin, S. J. (2018). Extracellular neutrophil proteases are efficient regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 cytokine activity but poor effectors of microbial killing. *Cell reports*, *22*(11), 2937-2950.

- ❖ Corliss, B. A., Azimi, M. S., Munson, J. M., Peirce, S. M., & Murfee, W. L. (2016). Macrophages: an inflammatory link between angiogenesis and lymphangiogenesis. *Microcirculation*, 23(2), 95-121.
- ❖ Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- ❖ Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- ❖ de Aragão Tavares, E., De Medeiros, W. M. T. Q., de Assis Pontes, T. P., Barbosa, M. M., De Araujo, A. A., de Araújo Jr, R. F., ... & De Medeiros, C. A. C. X. (2019). Chitosan membrane modified with a new zinc (II)-vanillin complex improves skin wound healing in diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1511.
- ❖ De Stefano, D., Maiuri, M. C., Simeon, V., Grassia, G., Soscia, A., Cinelli, M. P., & Carnuccio, R. (2007). Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN- γ . *European journal of pharmacology*, 566(1-3), 192-199.
- ❖ Debbache-Benaida, N., Atmani-Kilani, D., Schini-Keirith, V. B., Djebbli, N., & Atmani, D. (2013). Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9), 697-704.
- ❖ Debbache, N., Atmani, D., & Atmani, D. (2014). Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Industrial crops and products*, 53, 85-92.
- ❖ Debbache-Benaida, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Nassima, C., Boudaoud, H., ... & Atmani, D. (2018). Anti-hyperuricemic and neuroprotective effects of *Populus nigra* L.(Saliaceae) flower buds used in Algerian folk medicine. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 6, 471-482.

- ❖ Dini, I., & Grumetto, L. (2022). Recent advances in natural polyphenol research. *Molecules*, 27(24), 8777.

- ❖ Dudonné, S., Poupard, P., Coutiere, P., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J. M., & Vitrac, X. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4527-4536.

- ❖ Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazza, E., Izzo, A. A., ... & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.

- ❖ Dwivedi, D., Dwivedi, M., Malviya, S., & Singh, V. (2017). Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(1), 79-85.

- ❖ Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food bioscience*, 35, 100547.

- ❖ Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., & Kulma, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 160.

- ❖ Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 617-625.

- ❖ Elson, L. A., & Morgan, W. T. J. (1933). A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochemical Journal*, 27(6), 1824.

- ❖ Eseberri, I., Trepiana, J., Léniz, A., Gómez-García, I., Carr-Ugarte, H., González, M., & Portillo, M. P. (2022). Variability in the beneficial effects of phenolic compounds: A review. *Nutrients*, 14(9), 1925.

- ❖ Fournier, P. V. (2010). *Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France*. Paris: Omnibus. P. 750-752.

- ❖ Gasmi, A., Peana, M., Arshad, M., Butnariu, M., Menzel, A., & Bjørklund, G. (2021). Krebs cycle: activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis. *Archives of Toxicology*, 95(4), 1161-1178.

- ❖ Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. In *Nanoscience in dermatology* (pp. 1-14). Academic Press.

- ❖ Gokhale, J. P., Mahajan, H. S., & Surana, S. J. (2019). Quercetin loaded nanoemulsion-based gel for rheumatoid arthritis: *In vivo* and *in vitro* studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108622.

- ❖ Golubkina, N., Ulyana Plotnikova, U., Laptchenko, V., Laptchenko, H., Sheshnitsan, S., Amagova, Z., Matsadze, V., Naumenko, T., Bagrikova, N., Logvinenko, L., Sakhno, T., Chevchouk, O., Pirogov, N., Caruso, G. (2022). Evaluation of factors affecting tree and shrub bark's antioxidant status. *Plants*, 11(19), 2609-2625.

- ❖ González-Gallego, J., García-Mediavilla, M. V., Sánchez-Campos, S., & Tuñón, M. J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British journal of nutrition*, 104(S3), S15-S27.

- ❖ Goudjil, M. B. (2016). *Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques*. Thèse de doctorat, Université de Ouargla.

- ❖ Graham, H. K., Eckersley, A., Ozols, M., Mellody, K. T., & Sherratt, M. J. (2019). Human skin: composition, structure and visualisation methods. *Skin Biophysics: from experimental characterisation to advanced modelling*, 1-18.

- ❖ Guleria, I., Kumari, A., Lacaille-Dubois, M. A., Nishant, Kumar, V., Saini, A. K., ... & Lal, S. (2021). A review on the genus *Populus*: A potential source of biologically active compounds. *Phytochemistry Reviews*, 1-60.

- ❖ Gunasekaran, S., Nayagam, A. A. J., & Natarajan, R. (2020). Wound healing potentials of herbal ointment containing *Calendula officinalis* Linn. on the alteration of immunological markers and biochemical parameters in excision wounded animals. *Clinical Phytoscience*, 6, 1-8.
- ❖ Guo, S. A., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
- ❖ Gupta, S. C., Prasad, S., Kim, J. H., Patchva, S., Webb, L. J., Priyadarsini, I. K., & Aggarwal, B. B. (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural product reports*, 28(12), 1937-1955.
- ❖ Hachani, C., Abassi, M., Lazhar, C., Lamhamedi, M. S., & Béjaoui, Z. (2019). Allelopathic effects of leachates of *Casuarina glauca* Sieb. Ex Spreng. and *Populus nigra* L. on germination and seedling growth of *Triticum durum* Desf. under laboratory conditions. *Agroforestry Systems*, 93, 1973-1983.
- ❖ Hamdan, S., Pastar, I., Drakulich, S., Dikici, E., Tomic-Canic, M., Deo, S., & Daunert, S. (2017). Nanotechnology-driven therapeutic interventions in wound healing: potential uses and applications. *ACS central science*, 3(3), 163-175.
- ❖ Häne, K., & Kaennel Dobbertin, M. (2006). Le Peuplier noir, un géant aux pieds d'argile. *La forêt*, 7(8), 28-29.
- ❖ Herman, A., & Herman, A. P. (2020). Herbal Products in Postsurgical Wound Healing—Incision, Excision and Dead Space Wound Models. *Planta Medica*, 86(11), 732-748.
- ❖ Heydari, H., İşcan, G. S., Eryilmaz, M., Acikara, Ö. B., Sarialtin, S. Y., Tekin, M., & Çoban, T. (2019). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of some *Lathyrus* L.(Fabaceae) species growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(2), 240.

- ❖ Heymanns, A. C., Albano, M. N., da Silveira, M. R., Muller, S. D., Petronilho, F. C., Gainski, L. D., ... & Piovezan, A. P. (2021). Macroscopic, biochemical and histological evaluation of topical anti-inflammatory activity of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 264, 113139.
- ❖ Ho, J. C. M., Zheng, S., Comhair, S. A., Farver, C., & Erzurum, S. C. (2001). Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer research*, 61(23), 8578-8585.
- ❖ Irfan-Maqsood, M. (2018). Classification of wounds: know before research and clinical practice. *Journal of Genes and Cells*, 4(1), 1-4.
- ❖ Izah, S. C., Ogidi, O. I., Ogwu, M. C., Salimon, S. S., Yusuf, Z. M., Akram, M., ... & Iyingiala, A. A. (2024). Historical perspectives and overview of the value of herbal medicine. In *Herbal Medicine Phytochemistry: Applications and Trends* (pp. 3-35). Cham: Springer International Publishing.
- ❖ Jayapal, V., Subha, V., Pradeep, J., Salwe, K. J., Manimekalai, K., Rathinamala, R., & Kumar, S. R. (2023). Evaluation of wound healing potential of the essential oil of *Ocimum sanctum* L.(Thulasi/basil) containing ointment in female Wistar albino rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 12(1), 189-193.
- ❖ Jedinak, A., Valachova, M., Maliar, T., & Šturdík, E. (2010). Antiprotease activity of selected Slovak medicinal plants. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(2), 137-140.
- ❖ Jeong, Y. E., & Lee, M. Y. (2018). Anti-inflammatory activity of *Populus deltoides* leaf extract via modulating NF- κ B and p38/JNK pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3746.
- ❖ Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.

- ❖ Karam, M. B., El Khoury, J., Chakar, C., Changotade, S., Lutomski, D., Naaman, N., ... & Senni, K. (2021). Heparan-mimetics: potential agents of tissue regeneration for bone and periodontal therapies. *Medicine in Novel Technology and Devices*, 11, 100066.
- ❖ Karim, N., Khan, I., Khan, W., Khan, I., Khan, A., Halim, S. A., ... & Al-Harrasi, A. (2019). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of asparacosin a involve selective cyclooxygenase 2 and inflammatory cytokines inhibition: An *in-vitro*, *in-vivo*, and *in-silico* approach. *Frontiers in immunology*, 10, 581.
- ❖ Kaur B, Singh P. (2022). Inflammation: Biochemistry, cellular targets, anti-inflammatory agents and challenges with special emphasis on cyclooxygenase-2. *Bioorganic Chemistry*, 121,105663.
- ❖ Kusic, B., Miric, D., Dragojevic, I., Rasic, J., & Popovic, L. (2016). Role of myeloperoxidase in patients with chronic kidney disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 1069743.
- ❖ Kis, B., Avram, S., Pavel, I. Z., Lombrea, A., Buda, V., Dehelean, C. A., ... & Danciu, C. (2020). Recent advances regarding the phytochemical and therapeutic uses of *Populus nigra* L. buds. *Plants*, 9(11), 1464.
- ❖ Kobayashi, A., Suzuki, Y., & Sugai, S. (2020). Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. *The Journal of Toxicological Sciences*, 45(9), 515-537.
- ❖ Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203–213.
- ❖ Kolimi, P., Narala, S., Nyavanandi, D., Youssef, A. A. A., & Dudhipala, N. (2022). Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: trajectory and recent advancements. *Cells*, 11(15), 2439.

- ❖ Krimat, S., Dob, T., Lamari, L., Boumeridja, S., Chelghoum, C., Metidji, H. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(6), 478-83.
- ❖ Kumadoh, D., Ofori-Kwakye, K. (2017). Dosage forms of herbal medicinal products and their stability considerations-an overview. *Journal of Critical Reviews*, 4(4), 1-8.
- ❖ Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports*, 24, e00370.
- ❖ Kus, P., Jerković, I., Jakovljević, M., & Jokić, S. (2018). Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO₂ and its optimization by response surface methodology. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 152, 128-136.
- ❖ Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2013). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 41(6), 317-320.
- ❖ Leconte, S. (2013). " Plaie chronique : infectée ou non ?". *Minerva: revue d'évidence-based medicine*, 12, 10.
- ❖ Lecturio. (2024). Myeloperoxidase deficiency. En ligne <https://www.lecturio.com/concepts/myeloperoxidase-deficiency/>
- ❖ Leelaprakash, G., & Dass, S. M. (2011). *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(3), 189-196.
- ❖ Leite, P. M., Camargos, L. M., & Castilho, R. O. (2021). Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective. *European Journal of Integrative Medicine*, 41, 101270.

- ❖ Lephart, E. D. (2017). Resveratrol, 4' acetoxy resveratrol, R-equol, racemic equol or S-equol as cosmeceuticals to improve dermal health. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1193.
- ❖ Levin, R., Grinstein, S., & Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological reviews*, 273(1), 156-179.
- ❖ Le Hir, A., Charrueau, C., Brossard, D., Chaumeil, J. C., Crauste-Manciet, S. (2016). *Pharmacie galénique : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*. Elsevier Health Sciences.
- ❖ Lévesque, H., & Lafont, O. (2000). L'aspirine à travers les siècles: rappel historique. *La revue de médecine interne*, 21, S8-S17.
- ❖ Li, K., Diao, Y., Zhang, H., Wang, S., Zhang, Z., Yu, B., ... & Yang, H. (2011). Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 11, 1-9.
- ❖ Liang, C., Jia, M., Tian, D., Tang, Y., Ju, W., Ding, S., ... & Wang, X. (2017). Edible sturgeon skin gelatine films: Tensile strength and UV light-barrier as enhanced by blending with esculine. *Journal of Functional Foods*, 37, 219-228.
- ❖ Lindley, L. E., Stojadinovic, O., Pastar, I., & Tomic-Canic, M. (2016). Biology and biomarkers for wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 138(3S), 18S-28S.
- ❖ Lin, Y. K., & Kuan, C. Y. (2010). Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. *Food chemistry*, 119(3), 1271-1277.
- ❖ Lipinski, L. C., de Figueiredo Wouk, A. F. P., da Silva, N. L., Perotto, D., & Ollhoff, R. D. (2012). Effects of 3 topical plant extracts on wound healing in beef cattle. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 9(4), 542-547.

- ❖ Liu, K., Luo, M., & Wei, S. (2019). The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: Evidences and perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019(1), 6713194.
- ❖ Lodhi, S., & Vadnere, G. P. (2017). Relevance and perspectives of experimental wound models in wound healing research. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(7), 57-62.
- ❖ Lotfollahi, Z. (2024). The anatomy, physiology and function of all skin layers and the impact of ageing on the skin. *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, 32(1), 6-10.
- ❖ Maack, A., & Pegard, A. (2016). *Populus nigra* (Salicaceae) absolute rich in phenolic acids, phenylpropanoïds and flavonoids as a new potent tyrosinase inhibitor. *Fitoterapia*, 111, 95-101.
- ❖ Macovescu, G., Chelaru, C., Kaya, M. G. A., & Luminița, A. L. B. U. (2016). Determination of hydroxyproline in collagen biomaterials for medical use and validation of method. *Revista de Pielarie Incaltaminte*, 16(2), 147.
- ❖ Mailoa, M. N., Mahendradatta, M., Laga, A., & Djide, N. (2013). Tannin extract of guava leaves (*Psidium guajava* L.) variation with concentration organic solvents. *International Journal of Scientific and Technology Research*, 2(9), 106-110.
- ❖ Maksimović, Z., Malenčić, Đ., & Kovačević, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource technology*, 96(8), 873-877.
- ❖ Manaargadoo-Catin, M. (2015). *Etude des interactions entre les cellules sanguines et les tensioactifs*. Thèse de doctorat, Université Montpellier.
- ❖ Marchi, R. C., Campos, I. A., Santana, V. T., & Carlos, R. M. (2022). Chemical implications and considerations on techniques used to assess the *in vitro* antioxidant activity of coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 451, 214275.

- ❖ Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474.
- ❖ Marnotte, P., Carrara, A., Dominati, E. & Girardot F. (2006). Plantes des rizières de Camargue. 494 Cirad, CFR, PNRC.
- ❖ Martinengo, L., Olsson, M., Bajpai, R., Soljak, M., Upton, Z., Schmidtchen, A., & Järbrink, K. (2019). Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Annals of epidemiology*, 29, 8-15.
- ❖ Martinez-Gonzalez, A. I., Díaz-Sánchez, Á. G., de la Rosa, L. A., Vargas-Requena, C. L., Bustos-Jaimes, I., & Alvarez-Parrilla, E. (2017). Polyphenolic compounds and digestive enzymes : *In vitro* non-covalent interactions. *Molecules*, 22(4), 669.
- ❖ McKnight, G., Shah, J., & Hargest, R. (2022). Physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 40(1), 8-12.
- ❖ Medellín-Luna, M. F., Castaneda-Delgado, J. E., Martínez-Balderas, V. Y., & Cervantes-Villagrana, A. R. (2019). Medicinal plant extracts and their use as wound closure inducing agents. *Journal of Medicinal Food*, 22(5), 435-443.
- ❖ Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3), 47.
- ❖ Melguizo-Rodríguez, L., de Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Illescas-Montesa, R., Costela-Ruiz, V. J., & García-Martínez, O. (2021). Potential effects of phenolic compounds that can be found in olive oil on wound healing. *Foods*, 10(7), 1642.
- ❖ Merghache, D., Boucherit-Otmani, Z., El Haci, I., Merghachec, S., Chikhid, I., & Boucherita, K. (2016). Antioxidant and antimicrobial activities of Algerian *Populus nigra* L. buds extracts. *Brazilian Journal of Pharmaceutic Sciences*, 3, 1-8.

- ❖ Mi, Y., Zhong, L., Lu, S., Hu, P., Pan, Y., Ma, X., ... & Yang, G. (2022). Quercetin promotes cutaneous wound healing in mice through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 290, 115066.
- ❖ Mohanty, C., Das, M., & Sahoo, S. K. (2012). Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. *Molecular pharmaceutics*, 9(10), 2801-2811.
- ❖ Muñoz, C. C. (2013). Usos medicinales del chopo negro (*Populus nigra* L.). *Medicina naturista*, 7(2), 99-115.
- ❖ Naghavi, M., Tamri, P., & Asl, S. S. (2021). Investigation of healing effects of cinnamic acid in a full-thickness wound model in rabbit. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(1).
- ❖ Nasim, N., Sandeep, I. S., & Mohanty, S. (2022). Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects. *The Nucleus*, 65(3), 399-411.
- ❖ Ogunmoyole, T., Adeyeye, R. I., Olatilu, B. O., Akande, O. A., & Agunbiade, O. J. (2019). Multiple organ toxicity of *Datura stramonium* seed extracts. *Toxicology reports*, 6, 983-989.
- ❖ Olba-Zięty, E., Stolarski, M. J., Krzyżaniak, M., Rój, E., Tyśkiewicz, K., & Łuczyński, M. K. (2022). Supercritical production of extract from poplar containing bioactive substances—An economic analysis. *Industrial Crops and Products*, 184, 115094.
- ❖ Olczyk, P., Mencner, Ł., & Komosinska-Vassev, K. (2014). The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *BioMed research international*, 2014(1), 747584.
- ❖ Omoruyi, F., Sparks, J., Stennett, D., & Dilworth, L. (2020). Superoxide dismutase as a measure of antioxidant status and its application to diabetes. In *Diabetes* (pp. 409-417). Academic Press.

- ❖ Ostolski, M., Adamczak, M., Brzozowski, B., & Wiczowski, W. (2021). Antioxidant activity and chemical characteristics of supercritical CO₂ and water extracts from willow and poplar. *Molecules*, 26(3), 545.
- ❖ Oyedapo, O. O., Akinpelu, B. A., Akinwunmi, K. F., Adeyinka, M. O., & Sipeolu, F. O. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2(4), 46-51.
- ❖ Pachuau, L. (2015). Recent developments in novel drug delivery systems for wound healing. *Expert opinion on drug delivery*, 12(12), 1895-1909.
- ❖ Pagano, M., & Faggio, C. (2015). The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell biochemistry and function*, 33(6), 351-355.
- ❖ Pahlavani, N., Malekhamadi, M., Firouzi, S., Rostami, D., Sedaghat, A., Moghaddam, A. B., ... & Ghayour-Mobarhan, M. (2020). Molecular and cellular mechanisms of the effects of Propolis in inflammation, oxidative stress and glycemic control in chronic diseases. *Nutrition & metabolism*, 17, 1-12.
- ❖ Palacios, C. E., Nagai, A., Torres, P., Rodrigues, J. A., & Salatino, A. (2021). Contents of tannins of cultivars of sorghum cultivated in Brazil, as determined by four quantification methods. *Food Chemistry*, 337, 127970.
- ❖ Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134-147.
- ❖ Parvin, S., Reza, A., Das, S., Miah, M. M. U., & Karim, S. (2023). Potential Role and International Trade of Medicinal and Aromatic Plants in the World. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*, 5(5), 89-99.

- ❖ Pașca, C., Mărghitaș, L. A., Bobiș, O., Dezmirean, D. S., Mărgăoan, R., & Mureșan, C. (2016). Total Content of Polyphenols and Antioxidant Activity of Different Melliferous Plants. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 73(1).
- ❖ Patel, K., Mishra, R., & Patel, D. K. (2016). A review on phytopharmaceutical importance of asiaticoside. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(12), 1000-1007.
- ❖ Pattnaik, S., Mohanty, S., Sahoo, S. K., & Mohanty, C. (2023). A mechanistic perspective on the role of phytoconstituents-based pharmacotherapeutics and their topical formulations in chronic wound management. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 84, 104546.
- ❖ Peng, S., Wei, P., Lu, Q., Liu, R., Ding, Y., & Zhang, J. (2018). Beneficial Effects of Poplar Buds on Hyperglycemia, Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Streptozotocin-Induced Type-2 Diabetes. *Journal of Immunology Research*, 2018(1), 7245956.
- ❖ Pharmacopée française. (1983). Pharmacopée française (édition 10e). Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville.
- ❖ Pizzi, A. (2021). Tannins medical/pharmacological and related applications: A critical review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 22, 100481.
- ❖ Poblócka-Olech, L., Inkielewicz-Stepniak, I., & Krauze-Baranowska, M. (2019). Anti-inflammatory and antioxidative effects of the buds from different species of *Populus* in human gingival fibroblast cells: Role of bioflavanones. *Phytomedicine*, 56, 1-9.
- ❖ Polerà, N., Badolato, M., Perri, F., Carullo, G., & Aiello, F. (2019). Quercetin and its natural sources in wound healing management. *Current Medicinal Chemistry*, 26(31), 5825-5848.

- ❖ Poligone, B., & Baldwin, A. S. (2001). Positive and negative regulation of NF- κ B by COX-2: roles of different prostaglandins. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38658-38664.
- ❖ Popović, B. M., Štajner, D., Ždero-Pavlović, R., Tumbas-Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., & Orlović, S. (2016). Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 242-250.
- ❖ Proksch, E. (2018). pH in nature, humans and skin. *The Journal of dermatology*, 45(9), 1044-1052.
- ❖ Punjataewakupt, A., Napavichayanun, S., & Aramwit, P. (2019). The downside of antimicrobial agents for wound healing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, 39-54.
- ❖ Qadir, M. I., Naqvi, S. T. Q., Muhammad, S. A., Qadir, M., & Naqvi, S. T. (2016). Curcumin: a polyphenol with molecular targets for cancer control. *Asian pacific journal of cancer prevention*, 17(6), 2735-2739.
- ❖ Rafiei, P., Raeeszadeh, M., & Mohammadzadeh, P. (2024). Comparative efficacy of *Salix aegyptiaca*'s active compound versus phenytoin in healing full-thickness rat skin wounds: An animal model study. *Journal of Tissue Viability*, 33(1), 135-143.
- ❖ Rambaran, T. F. (2020). Nanopolyphenols: A review of their encapsulation and anti-diabetic effects. *SN Applied Sciences*, 2(8), 1335.
- ❖ Ramos, P. A., Moreirinha, C., Santos, S. A., Almeida, A., Freire, C. S., Silva, A. M., & Silvestre, A. J. (2019). Valorisation of bark lipophilic fractions from three *Portuguese Salix* species: A systematic study of the chemical composition and inhibitory activity on *Escherichia coli*. *Industrial Crops and Products*, 132, 245-252.
- ❖ Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., & Satayavivad, J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase

- activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45(2), 328-336.
- ❖ Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., & Saparov, A. (2021). Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 11(5), 700.
 - ❖ Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978.
 - ❖ Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665-706.
 - ❖ Rodriguez-Palacios, A., Kodani, T., Kaydo, L., Pietropaoli, D., Corridoni, D., Howell, S., ... & Cominelli, F. (2015). Stereomicroscopic 3D-pattern profiling of murine and human intestinal inflammation reveals unique structural phenotypes. *Nature communications*, 6(1), 7577.
 - ❖ Sadar, S. S., Vyawahare, N. S., & Bodhankar, S. L. (2016). Ferulic acid ameliorates TNBS-induced ulcerative colitis through modulation of cytokines, oxidative stress, iNOs, COX-2, and apoptosis in laboratory rats. *EXCLI journal*, 15, 482.
 - ❖ Saifullah, M., McCullum, R., McCluskey, A., & Vuong, Q. (2020). Comparison of conventional extraction technique with ultrasound assisted extraction on recovery of phenolic compounds from lemon scented tea tree (*Leptospermum petersonii*) leaves. *Heliyon*, 6(4).
 - ❖ Salam, U., Ullah, S., Tang, Z. H., Elateeq, A. A., Khan, Y., Khan, J., ... & Ali, S. (2023). Plant metabolomics: An overview of the role of primary and secondary metabolites against different environmental stress factors. *Life*, 13(3), 706.
 - ❖ Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., & Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Extraction and isolation of phenolic compounds. *Natural products isolation*, 427-464.

- ❖ Saqib, F., Ali, A., Ahmedah, H. T., Irimie, C. A., Toma, S. I., Popovici, B. E., ... & Irimie, M. (2021). Cardioprotective, hypotensive and toxicological studies of *Populus ciliata* (Wall. ex Royle). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *142*, 112065.
- ❖ Schauenberg, P., & Paris, F. (1974). Guide des plantes medicinales-2.
- ❖ Schousboe, A., Bak, L. K., & Waagepetersen, H. S. (2013). Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Frontiers in endocrinology*, *4*, 102.
- ❖ Schultz, G. S., Davidson, J. M., Kirsner, R. S., Bornstein, P., & Herman, I. M. (2011). Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair and Regeneration*, *19*(2), 134-148.
- ❖ Senani, N., Bedouhene, S., & Houali, K. (2023). Peroxidase activity as a biochemical marker of insecticide use in vegetables. *Acta Agriculturae Slovenica*, *119*(2), 1-9.
- ❖ Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, J., Beguin, P., & Schneider, Y. J. (2012). Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. *Food chemistry*, *135*(1), 68-73.
- ❖ Seth, D., Cheldize, K., Brown, D., & Freeman, E. E. (2017). Global burden of skin disease: inequities and innovations. *Current dermatology reports*, *6*, 204-210.
- ❖ Shabbir, M., Khan, M. R., & Saeed, N. (2013). Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. *BMC complementary and alternative medicine*, *13*, 1-13.
- ❖ Shahwar, D., Raza, M. A., Shafiq-Ur-Rehman, Abbasi, M. A., & Atta-Ur-Rahman. (2012). An investigation of phenolic compounds from plant sources as trypsin inhibitors. *Natural product research*, *26*(12), 1087-1093.

- ❖ Sharma, Y., Kaur, A., Bhardwaj, R., Srivastava, N., Lal, M., Madan, S., & Bala, K. (2021). Preclinical assessment of stem of *Nicotiana tabacum* on excision wound model. *Bioorganic Chemistry*, 109, 104731.
- ❖ Shukla, S. K., Sharma, A. K., Gupta, V., & Yashavarddhan, M. H. (2019). Pharmacological control of inflammation in wound healing. *Journal of tissue viability*, 28(4), 218-222.
- ❖ Šiler, B., Skorić, M., Mišić, D., Kovačević, B., Jelić, M., Patenković, A., & Kurbalija Novičić, Z. (2014). Variability of european black poplar (*Populus nigra* L.) in the danube basin. *Vojvodinašume*, 128, 128.
- ❖ Simonaro, C. M. (2019). Lysosomes, lysosomal storage diseases, and inflammation. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*, 4, e160023.
- ❖ Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., ... & Al-Hiary, M. (2019). Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397-1400.
- ❖ Sirisha, V. L., & D'Souza, J. S. (2016). Polysaccharide-based nanoparticles as drug delivery systems. In *Marine OMICS* (pp. 663-702).
- ❖ Skórkowska-Telichowska, K., Czemplik, M., Kulma, A., & Szopa, J. (2013). The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68(4), e117-e126.
- ❖ Stanciauskaite, M., Marksa, M., Liaudanskas, M., Ivanauskas, L., Ivaskiene, M., & Ramanauskiene, K. (2021). Extracts of poplar buds (*Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and lithuanian propolis: Comparison of their composition and biological activities. *Plants*, 10(5), 828.
- ❖ Ständer, S., & Schmelz, M. (2024). Skin Innervation. *Journal of Investigative Dermatology*, 144(8), 1716-1723.

- ❖ Sorrentino, S., Studt, J. D., Medalia, O., & Sapra, K. T. (2015). Roll, adhere, spread and contract: structural mechanics of platelet function. *European journal of cell biology*, 94(3-4), 129-138.
- ❖ Stone, R. C., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K. I., & Tomic-Canic, M. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell and tissue research*, 365, 495-506.
- ❖ Tan, Y., Chang, S. K., & Zhang, Y. (2017). Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food chemistry*, 214, 259-268.
- ❖ Tang, Y. Z., & Liu, Z. Q. (2007). Free-radical-scavenging effect of carbazole derivatives on DPPH and ABTS radicals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 1095-1100.
- ❖ Thakur, R., Jain, N., Pathak, R., & Sandhu, S. S. (2011). Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(1), 438056.
- ❖ Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Tzanakakis, G. N., & Karamanos, N. K. (2010). Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *The FEBS journal*, 277(19), 3904-3923.
- ❖ Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, 97, 4-27.
- ❖ Todaro, L., Russo, D., Cetera, P., & Milella, L. (2017). Effects of thermo-vacuum treatment on secondary metabolite content and antioxidant activity of poplar (*Populus nigra* L.) wood extracts. *Industrial Crops and Products*, 109, 384-390.
- ❖ Tsala, D. E., Amadou, D., & Habtemariam, S. (2013). Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology*, 4(3), 532-60.

- ❖ Tsioufis, C., Bafakis, I., Kasiakogias, A., & Stefanadis, C. (2012). The role of matrix metalloproteinases in diabetes mellitus. *Current topics in medicinal chemistry*, 12(10), 1159-1165.
- ❖ Umopathy, E., Ndebia, E. J., Meeme, A., Adam, B., Menziwa, P., Nkeh-Chungag, B. N., & Iputo, J. E. (2010). An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(9), 789-795.
- ❖ Üstündaş, M., Yener, H. B., & Helvacı, Ş. Ş. (2018). Parameters affecting lycopene extraction from tomato powder and its antioxidant activity. *Anadolu University Journal of Science and Technology A-Applied Sciences and Engineering*, 19(2), 454-467.
- ❖ Vallet, S. D., Clerc, O., & Ricard-Blum, S. (2021). Glycosaminoglycan–protein interactions: the first draft of the glycosaminoglycan interactome. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 69(2), 93-104.
- ❖ Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology*, 15(11), 692-704.
- ❖ Wang, K., Ping, S., Huang, S., Hu, L., Xuan, H., Zhang, C., & Hu, F. (2013). Molecular mechanisms underlying the *in vitro* anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from Chinese propolis (poplar type). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 127672.
- ❖ Wen, L., Zhang, Z., Sun, D. W., Sivagnanam, S. P., & Tiwari, B. K. (2020). Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(11), 1826-1841.
- ❖ who.int. (2023). Médecine traditionnelle. En ligne <https://www.who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/traditional-medicine>
- ❖ Wilgus, T. A., Roy, S., & McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Advances in wound care*, 2(7), 379-388.

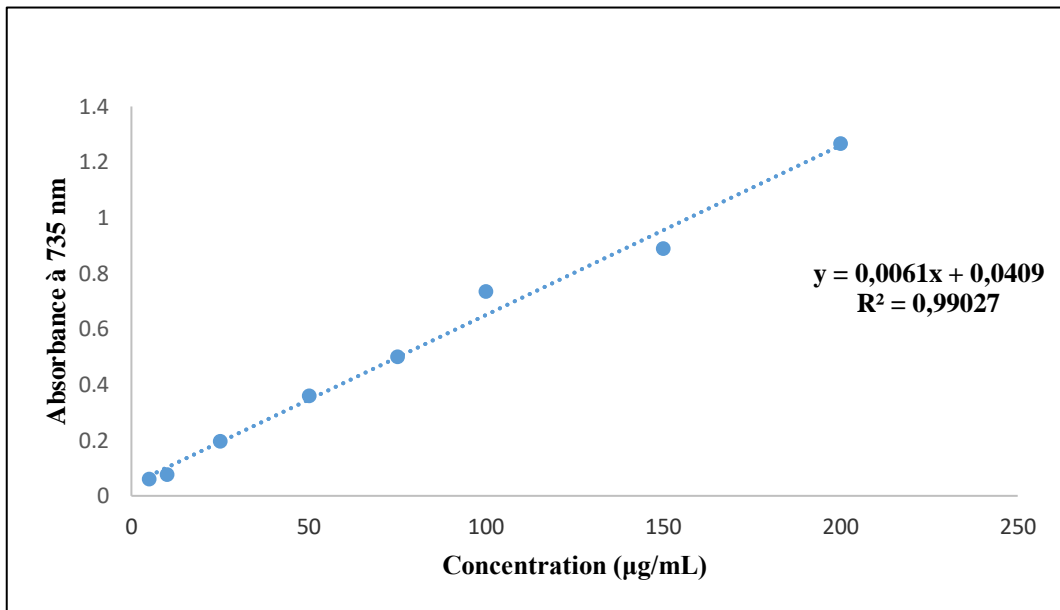
- ❖ Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, *10*(9), 200223.
- ❖ Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., & Hampton, M. B. (2016). Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annual review of biochemistry*, *85*(1), 765-792.
- ❖ Wong, B. W., Marsch, E., Treps, L., Baes, M., & Carmeliet, P. (2017). Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. *The EMBO journal*, *36*(15), 2187-2203.
- ❖ Wu, Z., Hou, Y., Dai, Z., Hu, C. A. A., & Wu, G. (2019). Metabolism, nutrition, and redox signaling of hydroxyproline. *Antioxidants & Redox Signaling*, *30*(4), 674-682.
- ❖ Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in wound care*, *4*(3), 119-136.
- ❖ Yadav, N., Parveen, S., Chakravarty, S., & Banerjee, M. (2019). Skin anatomy and morphology. *Skin Aging & Cancer: Ambient UV-R Exposure*, 1-10.
- ❖ Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, *10*(11), 1618.
- ❖ Yanez, D. A., Lacher, R. K., Vidyarthi, A., & Colegio, O. R. (2017). The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *469*, 455-463.
- ❖ Young, A., & McNaught, C. E. (2011). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, *29*(10), 475-479.
- ❖ Zaidi, S., Benaida-Debbache, N., Medjahed, Z., Tebbi, S. O., Kadi, R., & Saidene, N. (2023). A green approach for the sustainable and effective valorization from *Populus nigra* buds as a renewable source of high value-added extract using an alternative

solvent with prospective application in skin care formulation. *South African Journal of Botany*, 161, 666-677.

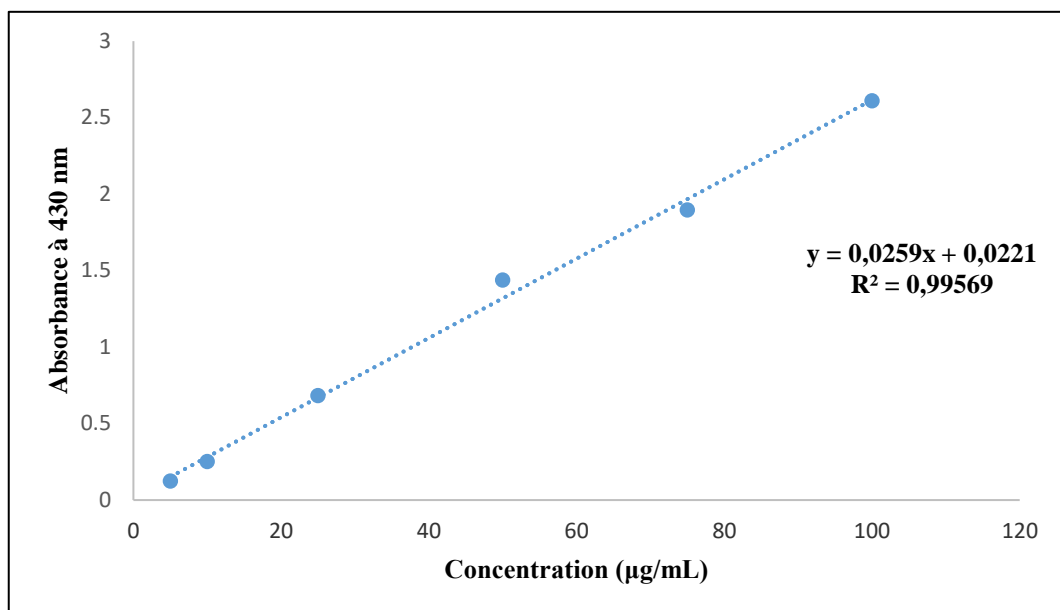
- ❖ Zeng, R., Lin, C., Lin, Z., Chen, H., Lu, W., Lin, C., & Li, H. (2018). Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions. *Cell and tissue research*, 374, 217-232.
- ❖ Zhang, Z., Liu, P., Su, W., Zhang, H., Xu, W., & Chu, X. (2021). Metabolic engineering strategy for synthesizing trans-4-hydroxy-L-proline in microorganisms. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-15.
- ❖ Zhao-Fleming, H., Hand, A., Zhang, K., Polak, R., Northcut, A., Jacob, D., ... & Rumbaugh, K. P. (2018). Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on post-surgical complications against the backdrop of the opioid crisis. *Burns & trauma*, 6.
- ❖ Zulkefli, N., Che Zahari, C. N. M., Sayuti, N. H., Kamarudin, A. A., Saad, N., Hamezah, H. S., ... & Sarian, M. N. (2023). Flavonoids as potential wound-healing molecules: Emphasis on pathways perspective. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4607.

Annexes

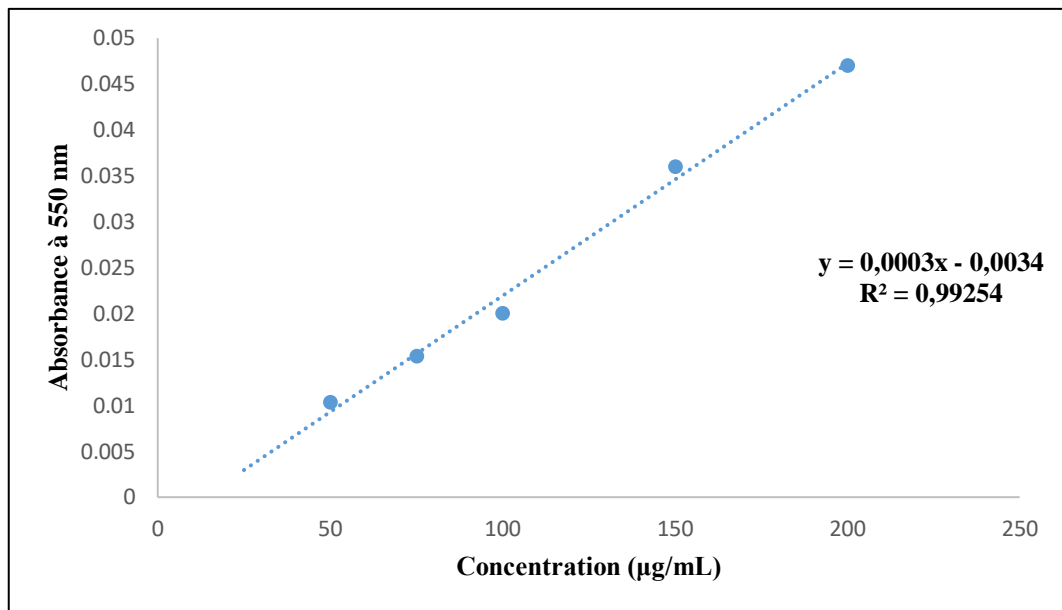
Annexe N°1 : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique ($\mu\text{g/mL}$) pour la quantification des phénols totaux.



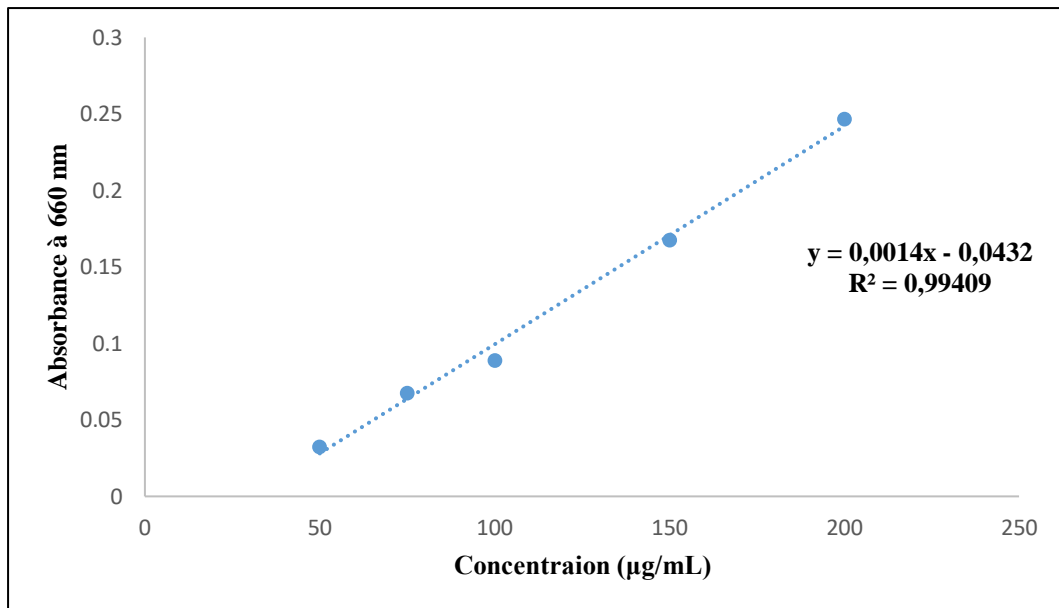
Annexe N°2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine ($\mu\text{g/mL}$) pour la quantification des flavonoïdes.



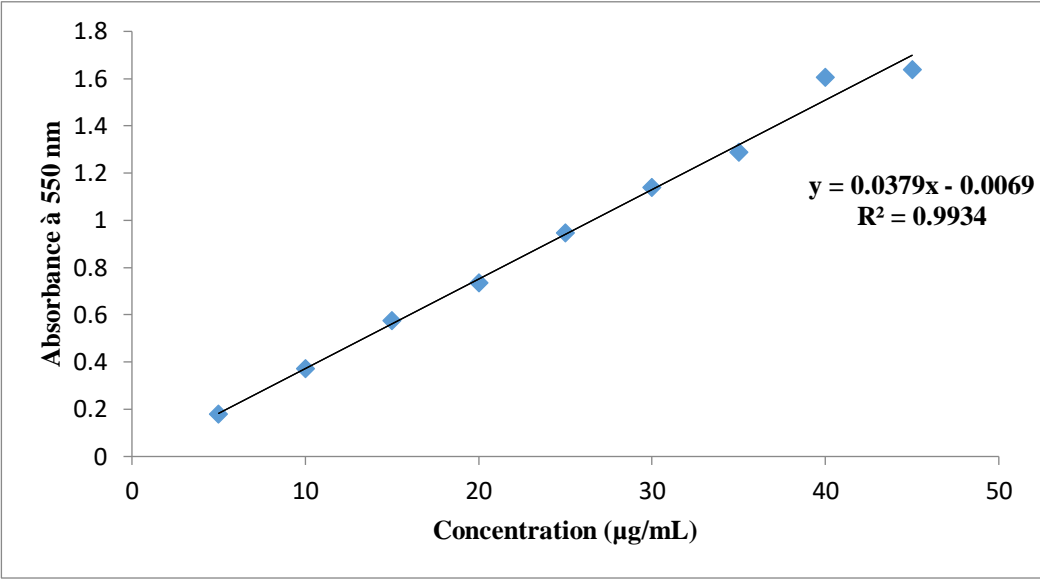
Annexe N°3 : Courbe d'étalonnage de la catéchine (µg/mL) pour la quantification des tanins condensés.



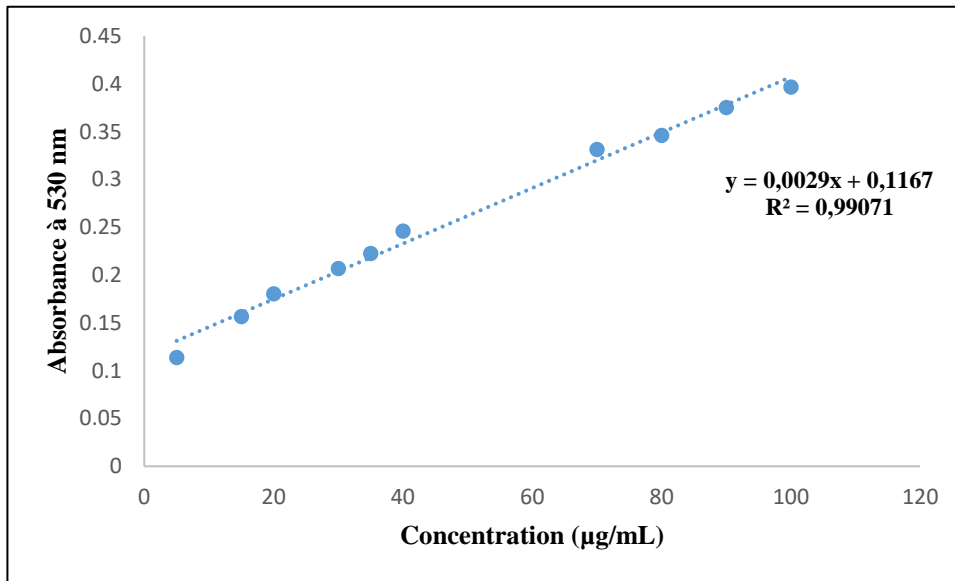
Annexe N°4 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique ($\mu\text{g/mL}$) pour la quantification des tanins hydrolysables.



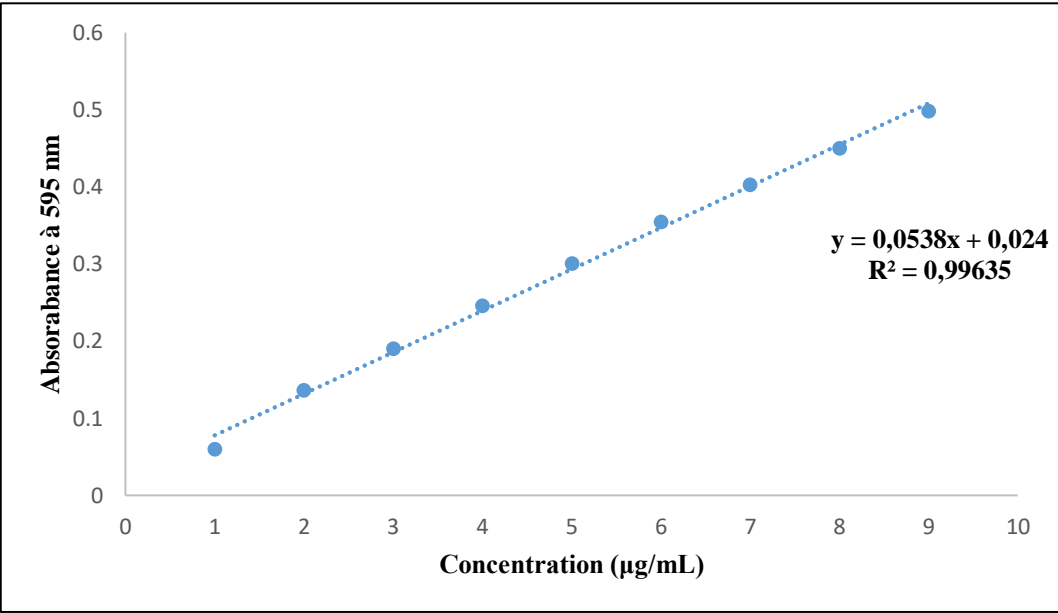
Annexe N°5 : Courbe d'étalonnage de l'hydroxyproline (µg/mL).



Annexe N°6 : Courbe d'étalonnage de l'hexosamine (µg/mL).



Annexe N°7 : Courbe d'étalonnage de l'albumine (µg/mL) pour la quantification des protéines.



Publications



Wound healing potential of a formula based on *Populus nigra* L. flower buds extract with anti-inflammatory activity

Amina Atia^{a,*}, Dina Atmani-Kilani^{a,**}, Djebbar Atmani^a, Karima Ayouni^a, Sarra Belkhir^a, Malika Benloukil^a, Naima Saidene^a, Kenza Moulouli^a, Souad Kasmi^a, Zineb Medjahed^b, Walid Boussebaa^c, Djamila Atmani^d

^a Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biochimie Appliquée, 06000, Bejaia, Algeria

^b Université de Jijel, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, 18000, Jijel, Algeria

^c Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques CRAPC, Alger, Algeria

^d Centre de Développement des Technologies Avancées, 16081, Alger, Algeria

ARTICLE INFO

Handling Editor: dr. P Fernandes

Keywords:

Populus nigra
Wound healing
Collagen
Inflammation
Cyclooxygenase

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Wound healing is a complex and dynamic process supported by a myriad of cellular events that are tightly coordinated to repair efficiently damaged tissue. *Populus nigra* L. (Salicaceae) flower buds are traditionally used in the treatment of dermatitis, upper respiratory tract infections, rheumatism and wounds.

Aim of the study: The aim of this study was to assess the wound healing potential of black poplar ointment containing 10 or 20 % of *Populus nigra* ethanolic flower buds extract using the excision model in rats.

Materials and methods: Two ointments (10 and 20 %) were prepared from *Populus nigra* flower buds ethanolic extract and topically applied on the area of excised skin of the rats for either 14 or 20 days. Morphological, macroscopic, histological and biochemical parameters were evaluated.

Results: The results showed that the extract contained high amounts of total phenols (89.5 ± 7.7 mg caffeic acid equivalent/g of extract) and hydrolysable tannins (142.05 ± 2.55 mg tannic acid equivalent/g of extract), in correlation with strong DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity and beta-carotene bleaching with values of 96.31 ± 3.42 and 85.27 ± 1.79 %, respectively. Anti-inflammatory potential was illustrated by lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition (52.80 ± 0.2 and 53.88 ± 2.55 %, respectively). Treatment with *Populus nigra* ointment (10 and 20 %) promoted wound contraction of 97.37 ± 1.19 and 97.28 ± 0.91 %, respectively. The antioxidant marker enzymes, catalase (0.10 ± 0.001 ; 0.08 ± 0.003 U/mg protein) and superoxide dismutase (363.34 ± 24.37 ; 317.82 ± 53.83 U/mg protein) activities in the granulation tissues were upgraded with respective treatments of 10 or 20 % ointment. Concurrently, the myeloperoxidase activity (2.21 ± 1.01 ; 2.13 ± 0.75 U/mg protein) was repressed, indicating anti-inflammatory potential, when compared to untreated, standard and excipient groups. Moreover, a significant increase in respective levels of hydroxyproline ($p < 0.001$) (28.05 ± 1.20 ; 25.29 ± 1.17 µg/mg tissue) and hexosamine ($p < 0.05$) (20.18 ± 1.21 ; 18.95 ± 1.98 µg/mg tissue) was triggered, reflecting a high regeneration of collagen in the scarred tissue. Histological examination of treated skin tissue revealed higher rates of re-epithelialization, lower neutrophils infiltration and re-vascularization in comparison to the control group.

Conclusion: Given that the 10 % ointment was the optimal concentration, our findings offer an efficient drug formula for wound healing.

1. Introduction

Skin wounds constitute a major public health concern, exerting a

significant impact on morbidity, mortality and healthcare economics, pertaining to the fact that almost one billion patients suffer from acute and chronic wounds (Raziyeve et al., 2021). The skin is a complex,

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: amina.atia@univ-bejaia.dz (A. Atia), dina.kilani@univ-bejaia.dz (D. Atmani-Kilani).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118319>

Received 4 March 2024; Received in revised form 5 May 2024; Accepted 7 May 2024

Available online 8 May 2024

0378-8741/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

multifunctional organ that acts as a protective barrier against pathogens, physical or chemical damage, as well as ultraviolet radiation (UV). Additionally, it contributes to the maintenance of body homeostasis. Injury inflicted to the skin triggers a wound healing process, which is characterized by four stages: homeostasis, inflammation, proliferation and remodeling (Wilkinson and Hardman, 2020). Homeostasis is promoted through vasoconstriction and the formation of a fibrin clot in preparation for the inflammatory phase, where neutrophils and macrophages migrate into the wound site. The following proliferative phase is crucial for neovascularization to occur, leading to collagen production by fibroblasts, the formation of granulation tissue, re-epithelialization and wound retraction (Cañedo-Dorantes and Cañedo-Ayala, 2019). At the end of the wound healing process, the remodeling phase takes place and may last several years, leading to the development of a mature collagen that strengthens the scarred tissue (Raziyeva et al., 2021).

If disturbed, mainly by pro-inflammatory oxidative stress and microbial infections, the wound healing process will be delayed, and may lead to impaired cicatrization and chronic inflammation (Pattnaik et al., 2023). Therefore, modern approaches to wound care are often associated with anti-inflammatory and antimicrobial drugs with side effects, namely on fibroblast activity and collagen synthesis, restricting their effectiveness in managing the healing process (Cialdai et al., 2022).

On the other hand, plant extracts with valuable traditional support have recently been highlighted as potential agents for the treatment of inflammation (Belkhir et al., 2024) and various inflammation-related diseases such as cancer (Ma et al., 2022; Dehnoee et al., 2023b) and neurological disorders (Wang et al., 2020).

Phytoconstituents-based formulations may offer an interesting alternative to modern drugs, mainly due to their safety and cost-effectiveness, in addition to their intrinsic anti-inflammatory and antioxidant properties (Dehnoee et al., 2023a; Pattnaik et al., 2023). Recent studies have proved the efficiency of nano-formulations against acute myeloid leukemia (Ahmeda et al., 2020a) and acute lymphoblastic leukemia (Ma et al., 2022). They also elicited cell death-suppressing effects on nerve cells (Wang et al., 2020). More importantly, a copper nanoparticle-based ointment containing *Allium eriophyllum* Boiss leaf aqueous extract (Zhao et al., 2022) significantly improved wound healing in rats. Similarly, *Fraxinus angustifolia* extract incorporated into nanovesicles promoted wound healing in a TPA mouse model (Moulaoui et al., 2015). Previous studies have suggested that the therapeutic wound healing potency of plants is related to their ability to promote the proliferation of keratinocytes and thus the remodeling of the extracellular matrix (Speroni et al., 2002; Rosa et al., 2014). *Populus nigra* L., commonly known as black poplar, belongs to the largest genus of *Populus* in the Salicaceae family (Guleria et al., 2021) and is largely distributed in deciduous forests around the globe in Asia, Canada, Europe and Africa. In the Mediterranean region, black poplar flower buds are used in the form of decoction, infusion or ointment in the treatment of dermatitis, respiratory infections, rheumatism, hemorrhoid and especially wound healing (Muñoz, 2013). In Algeria, researchers valorized these ethnopharmacological attributes by investigating their antioxidant, vasorelaxant, hepatoprotective (Debbache-Benaidia et al., 2013), anti-microbial (Debbache et al., 2014), anti-inflammatory, and anti-hyperuricemic (Merghache et al., 2016; Debbache-Benaidia et al., 2018; Boumghar et al., 2019) properties. Other researchers have presented evidence supporting the beneficial properties of *P. nigra* flower buds ethanolic extract on the skin including regeneration (Dudonné et al., 2011), lightning (Maack and Pegard, 2016) and photoprotective (Zaidi et al., 2023) effects. However, to date, no literature data have been found on their wound healing virtues. Phytochemical studies on this species have been prolific, highlighting that *P. nigra* flower buds are a rich source of flavonoids, with lead molecules such as kaempferol, apigenin, and pinocembrin. Moreover, phenolic acids including *p*-coumaric, caffeic and ferulic acids are abundant in poplar and propolis (poplar bud resinous exudate made by bees) (Stanciauskaite et al., 2021). In Algeria, phytochemical screening of black poplar flower buds

has revealed the presence of flavonoids, tannins, terpenoids and alkaloids (Merghache et al., 2016), which, by their antioxidant and anti-inflammatory potency, may enhance considerably the wound healing potential of *P. nigra*. The main emphasis of the present study was to evaluate the *in vivo* wound healing, anti-inflammatory and antioxidant potential of an ointment formulation elaborated with a combination of vaseline and *P. nigra* flower buds ethanolic extract. The *in vitro* antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of the extract were equally tested.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

Caffeic acid, quercetin, catechin, tannic acid, gallic acid were purchased from Chimoza (France), ethanol, heme, cyclooxygenase-1 enzyme (COX-1), arachidonic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu reagent, ethylenediaminetetracetic (EDTA) (>98%), chloroform (CHCl₃) (99%), casein, β-carotene, Ehrlich's reagent, hexosamine, chloramine T, hydroxyproline, vanillin, perchloric acid, acetyl acetone, N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD), trypsin from porcine pancreas were obtained from Sigma Aldrich (Germany), hydrochloride acid (HCl), aluminum chloride (AlCl₃), bovine serum albumin (BSA) from Alpha chemical (India), sodium carbonate (Na₂CO₃), sodium nitroprusside, naphthylethylenediamine, sulphanilamide, phosphoric acid (H₃PO₄) (>99%) were purchased from Prolabo (France), formaldehyde, hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), tris(Hydroxymethylamino-methane) hydrochloride (Tris-HCl) (C₄H₁₁NO₃.HCl) from BIOCHEM Chemopharma (France), lipoxygenase enzyme (LOX), linoleic acid from Sigma (USA), hydrogen peroxide (H₂O₂) (30%) from VWR International (France), *o*-dianisidine di-hydrochloride, indomethacin from Sigma-Aldrich (China), pyrogallol (C₆H₆O₃) from Fisher Scientific (UK), Muller Hinton broth (70,192-500G) and EMB agar were obtained from FLUKA Analytical.

2.2. Plant material

Populus nigra L. flower buds were collected in northern Algeria (GPS coordinates JWVC + WP6, Amizour) during spring 2021, and identified in the laboratory of botany (University of Bejaia, Algeria) according to a voucher herbarium specimen (voucher N° ph001.43) deposited at the National Superior School of Agronomy of El Harrach (Algiers, Algeria). The plant name has been checked with <https://www.worldfloraonline.org/> (<https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000928297>). The collected buds were put in an oven at 37 °C until complete dryness prior to analysis.

2.3. Extraction

P. nigra flower buds were ground in an automatic mixer (Kika Labortechnik, Staufen, Germany), then sieved into a fine powder <63 μm in diameter. The extraction was performed as previously described (Pollini et al., 2021) by mixing 1 g of the plant powder with 80 mL of ethanol (70 %). The suspension was subjected to ultrasound waves for 15 min at 40 °C, followed by filtration and centrifugation at 6000×g for 10 min to remove all traces of powder. The supernatant was collected and concentrated in a vacuum rotary evaporator at 40 °C to remove ethanol. The remaining aqueous extract was then lyophilized (CHRIST Alpha 1–2 LDplus freeze dryers, Germany) until completely dry and stored in a cool place (4 °C) until use.

2.4. Total phenolic, flavonoid and tannin contents

2.4.1. Quantification of total phenols

The amount of total phenols in *P. nigra* flower buds extract was

determined using the Folin-Ciocalteu procedure (Abdelouhab et al., 2023). A sample of 200 μL of extract was mixed with 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent and 800 μL of 7.5 % sodium carbonate (Na_2CO_3). The absorbance at 735 nm was determined after incubation for 30 min. The total phenolic content was expressed as caffeic acid equivalent in milligrams per gram of extract (mg CFAE/gE).

2.4.2. Quantification of total flavonoids

The content of total flavonoids was estimated according to the method of Abdelouhab et al. (2023), with minor modifications. The reaction mixture consisted of plant extracts (1 mL) and aluminum chloride (AlCl_3) (1 mL). Following incubation for 3 min, the absorbance was recorded at 407 nm. Results were expressed as quercetin equivalent in milligrams per gram of extract (mg QueE/gE).

2.4.3. Quantification of condensed and hydrolysable tannins

The content of condensed and hydrolysable tannins was determined using the method of Palacios et al. (2021). For condensed tannins, a sample of 50 μL of extract and 1.5 mL of 4 % vanillin were mixed, followed by the addition of 750 μL of concentrated HCl. The mixture was incubated at 30 $^\circ\text{C}$ for 20 min and the absorbance was recorded at 550 nm. Results were expressed as catechin equivalent in milligrams per gram of extract (mg CAE/gE).

The content of hydrolysable tannins was determined by mixing 1 mL of extract with 3.5 mL of 0.01 M FeCl_3 solution. After incubation for 5 min, the absorbance was recorded at 660 nm. Results were expressed as tannic acid equivalent in milligrams per gram of extract (mg TAE/gE).

2.5. Evaluation of antioxidant activity

2.5.1. DPPH radical scavenging activity

Radical scavenging activity of *P. nigra* flower buds extract was determined using a modified method described by Rangkadilok et al. (2007). A volume of 20 μL of extract or caffeic acid used as a reference compound (3.125–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to 180 μL of 100 μM DPPH ethanolic solution in a 96-well microplate. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was read at 517 nm. The antioxidant capacity (%) was calculated using the following equation (Eq. (1)):

$$\left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

A_0 : Absorbance of control.

A_1 : Absorbance of sample.

2.5.2. Beta-carotene bleaching method

This assay was carried out as described by Afsar et al. (2016) with minor modifications. β -carotene (1.0 mg) was dissolved in 2 mL of chloroform, followed by the addition of 25 μL of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After evaporating the chloroform under vacuum at 40 $^\circ\text{C}$, 50 mL of distilled water were added, and the mixture was vigorously shaken. *P. nigra* flower buds extract or the reference molecule, caffeic acid (3.125–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to 100 μL of the β -carotene/linoleic acid emulsion in each well of a 96-well microplate. After incubation at 55 $^\circ\text{C}$, the absorbance was measured at 460 nm. Readings of all samples were performed immediately ($t = 0$ min) and after 120 min of incubation. Antioxidant activity was calculated as the percentage of inhibition (I %) according to the following equation (Eq. (2)):

$$\left[1 - \frac{(A_{t_0} - A_{t_{120}})}{(A'_{t_0} - A'_{t_{120}})} \right] \times 100 \quad (2)$$

A_{t_0} : Absorbance of sample at t_0

$A_{t_{120}}$: Absorbance of sample at t_{120}

A'_{t_0} : Absorbance of control at t_0

$A'_{t_{120}}$: Absorbance of control at t_{120} .

2.6. Evaluation of anti-inflammatory activity

2.6.1. Nitric oxide scavenging activity

The NO^\cdot radical scavenging activity was estimated by the method outlined by Abd Ghafar et al. (2018). A volume of 50 μL of extract or caffeic acid used as standard (3.125–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was incubated with 50 μL of 10 mM sodium nitroprusside dissolved in PBS (pH 7.4) at room temperature in the light. After 150 min of incubation, 100 μL of Griess reagent containing sulphanilamide (1 %) and naphthylethylenediamine (0.1 %) in 5 % phosphoric acid was added and the absorbance was measured at 562 nm. The amount of nitric oxide radical inhibition was calculated using equation (Eq. (1)).

2.6.2. Anti-trypsin activity

Anti-trypsin activity was investigated according to the method of Leelaprakash and Dass (2011). The reaction mixture which comprised 1 mL of extract (3.125–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or caffeic acid used as standard, and 2 mL of 0.3 mg/mL trypsin dissolved in Tris-HCl (pH 7.4; 20 mM) was incubated for 5 min at room temperature. After adding 1 mL of casein (0.8 % w/v) and incubating for 20 min, the reaction was stopped by perchloric acid (70 %). Following centrifugation at 6000 \times g, the absorbance of the supernatant was determined at 210 nm. The trypsin inhibitory activity was calculated following equation (Eq. (1)).

2.6.3. Inhibition of lipoxygenase activity

Inhibition of lipoxygenase (LOX) was assessed following the method outlined by Leelaprakash and Dass (2011). A mixture of 2.92 mL of 0.2 M borate buffer (pH 9.5), 10 μL of lipoxygenase enzyme solution (20,000 U/mL) and 30 μL of extract at different concentrations (6.25–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was incubated for 5 min (25 $^\circ\text{C}$). The reaction was initiated by the addition of 40 μL of linoleic acid solution (0.6 mM), and the absorbance was measured at 234 nm. Indomethacin was used as a positive control. LOX inhibition was calculated using equation (Eq. (1)).

2.6.4. Inhibition of cyclooxygenase activity

Inhibition of cyclooxygenase (COX-1) was performed according to the method of Karim et al. (2019), with slight modifications. A mixture consisting of Tris-HCl (pH 8; 100 mM), 40 μL of extract or gallic acid (12.5–250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10 μL of heme and 10 μL of COX-1 enzyme was incubated in a microplate for 10 min at 25 $^\circ\text{C}$. The reaction was initiated by adding 20 μL of arachidonic acid and 20 μL of TMPD. The absorbance was measured at 603 nm with a microplate reader (Synergy-HTX, Biotek). The COX-1 inhibitory activity was calculated following equation (Eq. (1)).

2.7. Antibacterial susceptibility test

The antibacterial activity of *P. nigra* flower buds ethanolic extract was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) assay against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 as described by Stanciauskaite et al. (2021). For this purpose, *E. coli* was cultivated on EMB (Eosin Methylene Blue) agar, while *S. aureus* and *P. aeruginosa* were cultivated on MH (Mueller Hinton) agar at 37 $^\circ\text{C}$ for 24 h. Standard strain suspensions were prepared in physiological water according to McFarland norms. In a 96-well plate, 100 μL of MH medium was added to an equal volume of serial dilutions (1:2) of the extract (39–5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or the antibiotic ampicillin (7–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), followed by the addition of 100 μL of each bacterial suspension. After incubation at 37 $^\circ\text{C}$ for 24 h, the absorbance was measured spectrophotometrically at 630 nm and the MIC₉₀, defined as the lowest concentration of extract that caused growth inhibition ≥ 90 %, was determined.

2.8. In vivo wound healing activity

2.8.1. Ointment formulation

The ointment was prepared with petroleum jelly (vaseline) as an excipient (Begashaw et al., 2017). The two ointment concentrations 10 and 20 % (w/w) were prepared by mixing simple ointment base (90 g or 80 g) with 10 or 20 g of ethanolic extract (w/w), respectively. This process was conducted in a water bath (37 °C) with constant stirring until homogeneity was achieved. Subsequently, both ointments were kept in a cool place (4 °C) for better preservation.

2.8.2. Experimental animals

Fifty male albino Wistar rats (200–300 g) were purchased from Pasteur Institute (Algiers, Algeria). Animals were housed under standard laboratory conditions (26 ± 1 °C temperature, 65 ± 5 % relative humidity, 12/12 light and dark cycle) and provided with water and food *ad libitum*. They were handled according to the recommendations of the International Ethics Committee (Directive of the European Council (86/609/EC) for animal experiments) and the Ethical Committee of Directorate General for Scientific Research and Technological Development at the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (Registration N°: DO1N01UN280120150001).

2.8.3. Excision wound model

After fifteen days of adaptation to laboratory conditions, the excision wound model (Begashaw et al., 2017) was adopted to investigate the wound healing potential of both ointment formulations (10 and 20 %) based on *P. nigra* flower buds extract. After being weighted, the animals were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride and xylazine at doses of 25 mg/kg and 10 mg/kg, respectively. The animals were randomly divided into five groups (n = 10) as follows.

- Group I: control group with untreated excision.
- Group II: standard group treated with reference drug (madecassol).
- Group III: test group treated with 10 % ointment.
- Group IV: test group treated with 20 % ointment.
- Group V: control group treated with excipient.

Wounds were created on day 0 for all groups. The dorsal area of the animals was shaved with electric clippers, and then a circular skin wound (3 cm in diameter) was made with surgical scissors by removing all cutaneous layers, including dermis and hypodermis. The excisional wounds were left open and each rat was housed alone in a specific cage. The ointment, standard drug, or excipient was applied to the wound once a day during 14 days for some rats (n = 5) and 20 days for others (n = 5). Photos were taken every day to record macroscopic observations of wound morphology and contraction. The healing progression of the wound was assessed according to a score based on observations of erythema, swelling, pus appearance and crust formation (Ernest et al., 2019). Wound contraction was calculated daily for each animal and expressed as a percentage using the following equation (Eq. (3)):

$$(1 - (\text{specific day wound diameter}/\text{initial wound diameter})) \times 100 \quad (3)$$

On days 14 and 20, all animals were euthanized and the healed wound skin area was excised. Half of each sample was fixed in 10 % buffered formalin solution for histopathological analysis and the other half was immediately frozen (−80 °C) for biochemical study.

2.8.4. Biochemical study

The weighed granulation tissues were frozen and lyophilized. Subsequently, 40 mg of dried sample was hydrolyzed in 6 N HCl for 4 h at 120 °C. The resulting hydrolysate was then used for estimation of hydroxyproline and hexosamine levels.

2.8.4.1. Estimation of hydroxyproline levels.

Hydroxyproline levels were measured according to the method of Dwivedi et al. (2016) with minor modifications. A volume of 500 µL of the hydrolysate was evaporated to dryness, then 1 mL of chloramine T solution was added and the mixture was incubated for 20 min at room temperature. Subsequently, 1 mL of Ehrlich solution was added, and the reaction mixture was further incubated for 1 h at 60 °C. The absorbance was measured at 550 nm using a spectrophotometer. Hydroxyproline level was calculated from a linear standard curve and presented as µg/mg of dry tissue weight.

2.8.4.2. Estimation of hexosamine levels.

Hexosamine levels were evaluated using the method developed by Dwivedi et al. (2016), with minor modifications. The hydrolysate was evaporated to dryness, and then 1 mL of 2 % acetyl acetone was added. The resulting solution was heated to 90 °C for 15 min. After cooling, 5 mL of 95 % ethanol and 1 mL of Ehrlich reagent were added, mixed thoroughly, and kept at room temperature for 1 h. The absorbance was measured at 530 nm. The amount of hexosamine was calculated from a linear standard curve and presented as µg/mg of dry tissue weight.

2.8.4.3. Measurement of myeloperoxidase activity.

The measurement of myeloperoxidase (MPO) activity was carried out according to the method of Rodriguez-Palacios et al. (2015). Granulation tissue was homogenized in 0.5 % HTAB and potassium phosphate buffer (pH 6; 50 mM) and then centrifuged at 12500×g for 5 min at 4 °C. In a microplate, 10 µL of supernatant was mixed with 200 µL of PBS (pH 6.0) containing 5 mg/mL of *o*-dianisidine dihydrochloride and H₂O₂ (1 %). Any change in absorbance was recorded at 450 nm every 30 s for 5 min at 25 °C. MPO activity was calculated using the following equation (Eq. (4)):

$$\text{Units of MPO activity} = \Delta A_{450} \div 0.5 \div 0.0113 \div 0.05 \quad (4)$$

Where 0.0113 is the MPO constant, 0.5 is the time interval (30 s, or 0.5 min) and 0.05 is the dilution factor of the sample. Results were expressed as MPO units per milligram (U/mg) of protein.

2.8.4.4. Estimation of antioxidant enzymes.

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities were evaluated by homogenizing skin tissues in 0.1 M phosphate buffer (10 %, w/v) at pH 7.4, and centrifuging (10000×g) at 4 °C for 10 min.

The determination of CAT activity was carried out using the method of Alam et al. (2013), based on its ability to degrade hydrogen peroxide to oxygen and water. A sample of 20 µL of collected supernatant was added to 380 µL of potassium phosphate buffer (pH 6.8; 100 mM) and 1600 µL of H₂O₂ (37.5 mM). The CAT activity was calculated from the change in absorbance at 240 nm over 1 min. Results were expressed as micromoles of hydrogen peroxide decomposed/min/mg of protein.

SOD activity was estimated according to the method of Marklund and Marklund (1974). The assay mixture contained 10 µL of supernatant, 1.44 mL Tris-HCl buffer (pH 8.2; 50 mM) containing 10 mM EDTA, and 100 µL pyrogallol (15 mM). The absorbance was measured at 440 nm for 3 min and SOD activity was expressed as U/min/mg of protein, where a unit is equivalent to the amount of SOD required to inhibit 50 % of pyrogallol autoxidation.

2.8.5. Estimation of transaminases levels in blood

Transaminases levels were assessed by collecting rat blood on the 14th and 20th day. After centrifugation at 3000×g for 10 min, the serum was collected for the evaluation of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels.

2.8.6. Histological analysis

On day 14 or 20, rats were sacrificed and skin tissues were collected and fixed in formaldehyde 10 %, embedded in paraffin, serially sectioned (5 µm) and stained with hematoxylin–eosin (H&E). The prepared slides were examined under a light microscope at 400 x.

2.9. HPLC-MS analysis

Experiments were performed using an ultra-performance liquid chromatography UPLC (Shimadzu 8040) with a binary pump (Nexera XR LC-20AD). The UPLC system was coupled to a Q-3 mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI). The separation was achieved on a Restek Ultra C18 column (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) with two different solvent combinations as a mobile phase, consisting of solvent A (water/0.1 % formic acid) and solvent B (methanol/0.1 % formic acid). The elution parameters consisted of a flow rate of 0.4 mL/min and a sample volume of 5 μL. The solvent A gradient was as follows: 95 % (0.1–2 min), 95 % (2–15 min), 5 % (15–18 min), 5 % (18–20 min), 95 % (20–30 min). Compounds were identified by comparing their retention time and mass spectra with phenolic standards.

2.10. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± SD for *in vitro* tests and mean ± SEM for *in vivo* tests. Analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test was used to compare all experimental groups, and were computed by GraphPad Prism software version 9.0.2. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Quantification of total phenols, flavonoids and tannins

The levels of total phenols, flavonoids, condensed and hydrolysable tannins were determined to be 89.55 ± 7.76 mg CFA E/g of extract, 14.05 ± 0.36 mg QueE/g of extract, 55.77 ± 0 mg CA E/g of extract and 142.05 ± 2.5 mg TA E/g of extract, respectively (Table 1).

3.2. Antioxidant activity

Antioxidant activity was determined using the DPPH and the β-carotene bleaching assays. The results (Table 2) revealed that *P. nigra* flower buds ethanolic extract exhibited a high scavenging activity on DPPH (IC₅₀: 42.39 ± 2.42 μg/mL) which, nevertheless, remains low compared to that of caffeic acid (IC₅₀: 3.86 ± 0.20 μg/mL). On the other hand, the extract (IC₅₀: 17.82 ± 1.51 μg/mL) outperformed substantially caffeic acid (IC₅₀: 42.87 ± 8.47 μg/mL) in preventing β-carotene bleaching.

3.3. Anti-inflammatory activity

3.3.1. Nitric oxide radical scavenging and anti-trypsin activities

The ethanolic extract of *P. nigra* flower buds exhibited a dose-dependent inhibition on both nitric oxide and trypsin, as indicated by the IC₅₀ values (Table 3). The results indicated an interesting anti-inflammatory activity equivalent, in terms of percentages, to that of the standard, caffeic acid, for both the anti-NO[•] and anti-trypsin

Table 1

Determination of total phenols, flavonoids and tannins content in *P. nigra* flower buds extract.

Ethanolic bud extract	Total phenolic (mgCFAE/gE)	Flavonoids (mgQueE/gE)	Tannins Condensed (mgCAE/gE)	Hydrolysable (mgTAE/gE)
	89.55 ± 7.76	14.05 ± 0.36	55.77 ± 0	142.05 ± 2.5

Data are mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments in triplicate (n = 3). mg CFAE/gE: mg caffeic acid equivalent per gram of extract; mg QueE/gE: mg quercetin equivalent per gram of extract; mg CAE/gE: mg catechin equivalent per gram of extract; mg TAE/gE: mg tannic acid equivalent per gram of extract.

Table 2

Radical scavenging activity and β-carotene bleaching capacity of *P. nigra* flower buds extract and caffeic acid.

		Ethanolic extract	Caffeic acid
DPPH scavenging activity	% (at 100 μg/mL)	96.31 ± 3.42	92.01 ± 2.22
	IC ₅₀ (μg/mL)	42.39 ± 2.42	3.86 ± 0.20***
β-carotene bleaching capacity	% (at 100 μg/mL)	85.27 ± 1.79	64.83 ± 5.91*
	IC ₅₀ (μg/mL)	17.82 ± 1.51	42.87 ± 8.47*

Data are mean ± SD of three independent experiments in triplicate (n = 3). Significant difference for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ was calculated by comparing % antioxidant activity and IC₅₀ of ethanolic extract with caffeic acid.

Table 3

NO[•] scavenging and anti-trypsin activities of *P. nigra* ethanolic flower buds extract and caffeic acid.

		Ethanolic extract	Caffeic acid
NO [•] scavenging activity	% (at 100 μg/mL)	51.99 ± 0.11	58.27 ± 5.25
	IC ₅₀ (μg/mL)	82.67 ± 0.94	83.56 ± 4.02
Anti-trypsin activity	% (at 100 μg/mL)	52.88 ± 0.60	50.94 ± 2.06
	IC ₅₀ (μg/mL)	94.41 ± 2.32	24.53 ± 1.26***

Data are mean ± SD of three independent experiments in triplicate (n = 3). Significant difference for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ was calculated by comparing % anti-inflammatory activity and IC₅₀ of ethanolic extract with caffeic acid.

activities.

3.3.2. Inhibition of lipoxygenase and cyclooxygenase activities

Table 4 summarizes the *in vitro* inhibition of LOX and COX-1 activities by the ethanolic extract of *P. nigra* flower buds compared to standards. The inhibitory effect of the ethanolic extract on both pro-inflammatory enzymes LOX and COX-1 was dose-dependent, with higher inhibition on LOX (IC₅₀: 95.98 ± 0.54 μg/mL) than on COX-1 (IC₅₀: 234.28 ± 6.51 μg/mL). However, the effectiveness of the extract remains low compared to standards, indomethacin (IC₅₀: 28.57 ± 5.80 μg/mL against LOX) and gallic acid (IC₅₀: 121.44 ± 10.25 μg/mL against COX-1).

3.4. Antibacterial activity

In order to determine the MICs of the plant extract, the broth microdilution method was used. *P. nigra* ethanolic flower buds extract

Table 4

In vitro inhibition of *P. nigra* flower buds ethanolic extract on lipoxygenase (LOX) and cyclooxygenase (COX-1) enzymatic activities.

		Ethanolic extract	Standard (Indomethacin or Gallic acid)
LOX	% enzyme inhibition (at 100 μg/mL)	52.80 ± 0.20	95.11 ± 4.89***
	IC ₅₀ (μg/mL)	95.98 ± 0.54	28.57 ± 5.80***
COX	% enzyme inhibition (at 250 μg/mL)	53.88 ± 2.55	54.45 ± 1.61
	IC ₅₀ (μg/mL)	234.28 ± 6.51	121.44 ± 10.25***

Data are mean ± SD of three independent experiments in triplicate (n = 3). Significant difference for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ was calculated by comparing % enzyme inhibition and IC₅₀ of ethanolic extract with standards.

inhibited the growth of all tested microbial strains with MIC₉₀ values of 254.96 µg/mL, 312.0 µg/mL and 594.43 µg/mL for *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively, indicating that the inhibition on *E. coli* was the most significant. In comparison, the antibiotic ampicillin exhibited higher inhibition than the extract, with MIC₉₀ values of 22 µg/mL, 35.85 µg/mL and 15.63 µg/mL for *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively.

3.5. Wound healing activity of *P. nigra*

3.5.1. Determination of wound contraction

The healing effect of *P. nigra* ointment in the excision wound model was investigated over 14 and 20 days, using madecassol, one of the most common wound healing ointments, as a reference. The evaluation of a wound is primarily based on visual observations, which were recorded by taking daily pictures of the excision tissue site during the whole healing period (Fig. 1). The size of the scarred area was estimated daily by the calculation of wound contraction for each animal (Fig. 2).

At the beginning of this study, the wounds appeared to have a homogeneous and similar aspect in all groups. After the first week of treatment, control groups displayed an inflammatory bulb at the wound area, which was less conspicuous in the rats treated with *P. nigra* ointment. By the 14th day after wounding, the crusts started to slough off, leaving a red irritated area in control groups compared to a pink area in the test groups. By day 20, wound closure was complete in test groups compared to control groups (Fig. 1).

The tracing of wound contraction, depicted in Fig. 2, showed that the ointment, at both dose levels of 10 and 20 %, effectively promoted the healing process. The obtained results indicated a significant increase in wound contraction in the time interval between the 14th and 20th days, compared to both controls, reaching a maximum on day 20, with a higher wound closure in rats treated with the 10 % formula. In the control groups, whether untreated or treated with excipient, wound healing ratios were equivalent, with maximal percentages of 91.59 and 90.16 %, respectively, on day 20. The percentage of wound contraction in the standard group treated with the reference drug madecassol was

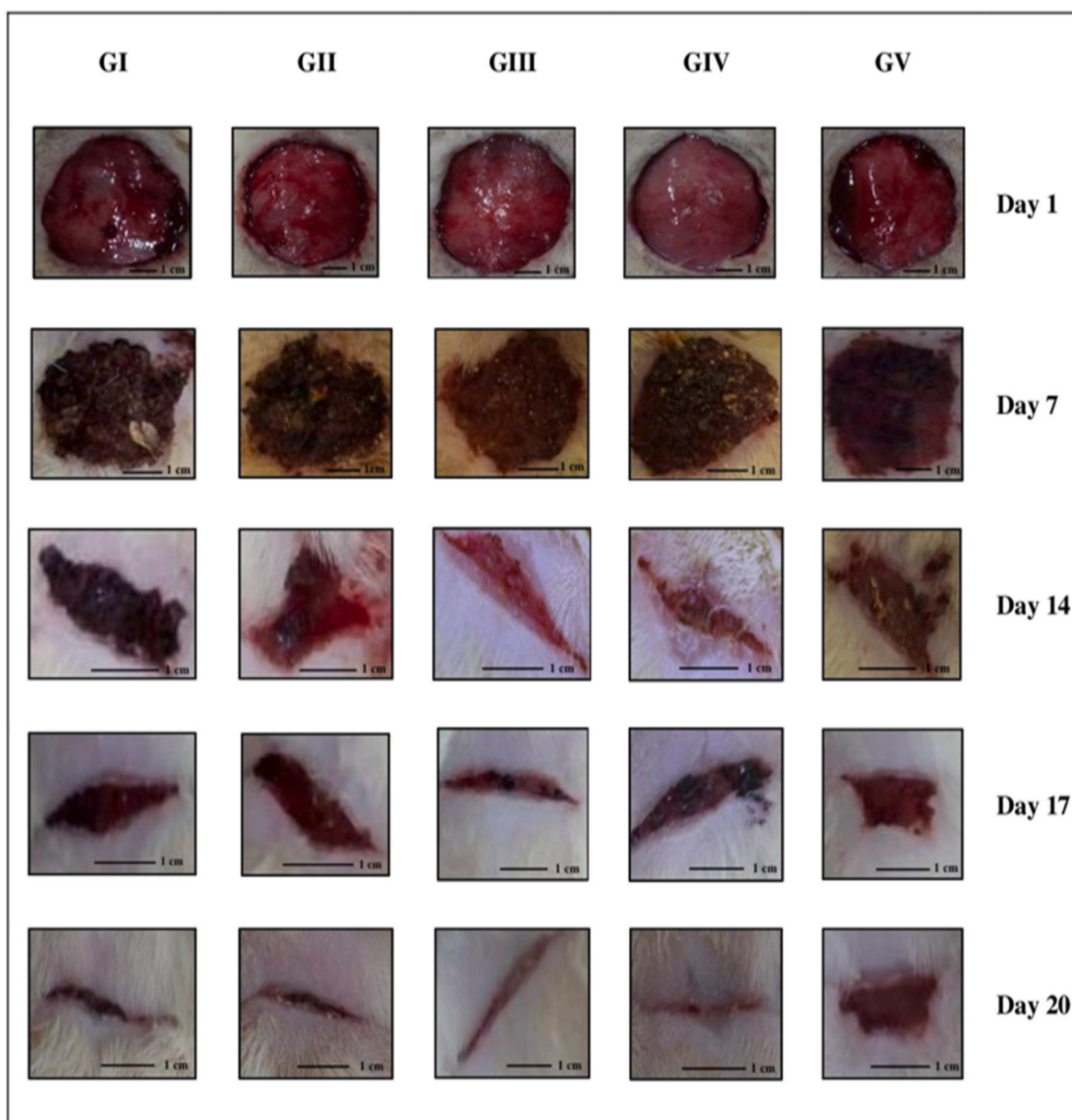


Fig. 1. Macroscopic changes in wound area in rats of GI (control group with untreated excision), GII (treated with standard), GIII (treated with ointment 10%), GIV (treated with ointment 20 %) or GV (control group treated with excipient) on days 1, 7, 14, 17 and 20 after wounding.

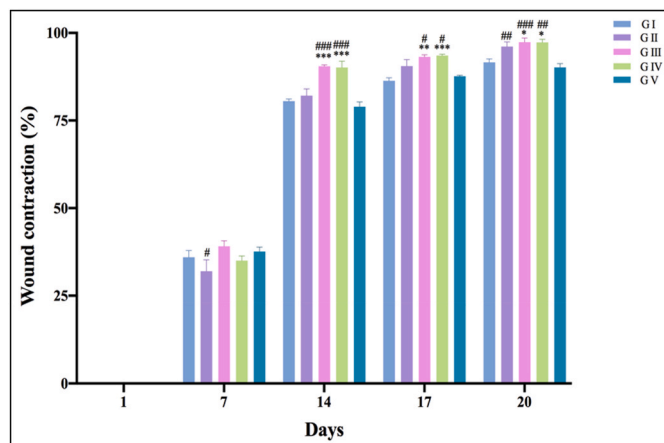


Fig. 2. Percentage of wound contraction in rats of GI (control group with untreated excision), GII (treated with standard), GIII (treated with ointment 10 %), GIV (treated with ointment 20 %) or GV (control group treated with excipient) on days 1, 7, 14, 17 and 20 after wounding. The results were expressed as mean \pm SEM (n = 5). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was used for statistical significance. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to group I and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared to group V.

82.1 % on the 14th day, significantly ($p < 0.001$) lower than that of the test groups.

3.5.2. Biochemical study

3.5.2.1. Estimation of hydroxyproline levels. The level of hydroxyproline in the granulation tissues of the skin of the different groups was evaluated at 14 and 20 days, as shown in Fig. 3. On the 14th day of treatment, apart from group III ($29.43 \pm 1.53 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue), no significant difference was noticed among all the groups compared to group I ($24.46 \pm 0.73 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue). On the other hand, on the 20th day, high hydroxyproline levels (24.31 ± 1.11 , 28.05 ± 1.20 , 25.29 ± 1.17 and $24.65 \pm 0.31 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue) were recorded in tissues of groups II, III, IV, and V treated with standard, ointments 10 and 20 % and excipient, respectively. These values were statistically significant ($p < 0.001$) when compared with group I.

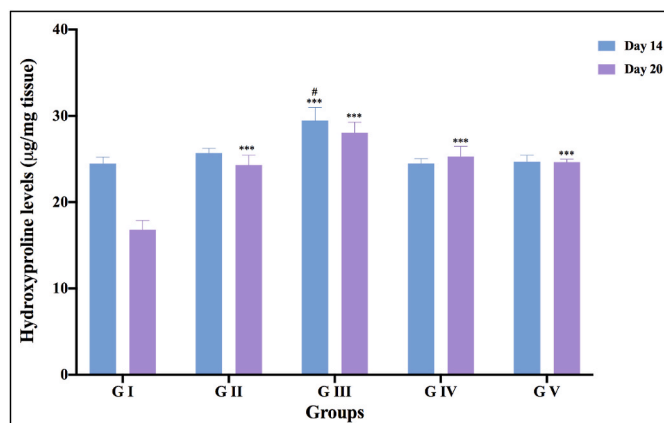


Fig. 3. Hydroxyproline levels ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue) in different groups on days 14 and 20 after wounding. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 5). (GI: control group with untreated excision, GII: treated with standard, GIII: treated with ointment 10 %, GIV: treated with ointment 20 %, GV: control group treated with excipient). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was used for statistical significance. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to group I on day 14 or on day 20 and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared to group V.

3.5.2.2. Estimation of hexosamine levels. The results illustrated in Fig. 4 indicate that the topical application of ointments 10 and 20 % induced a significant ($p < 0.001$) spike in hexosamine concentration on the 14th day with respective values of 34.34 ± 1.75 and $35.85 \pm 0.41 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue compared to group I ($25.51 \pm 1.34 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue). In contrast, no significant difference in hexosamine levels was found between groups II and V (26.33 ± 1.35 and $22.31 \pm 1.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue) compared to group I. Moreover, after 20 days of treatment, hexosamine levels decreased in all groups with significant ($p < 0.05$) differences between groups I ($14.11 \pm 0.88 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue) and III ($20.18 \pm 1.21 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue). A substantial difference was equally noted between the test groups and the excipient group ($13.15 \pm 0.82 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue).

3.5.2.3. Estimation of myeloperoxidase levels. As shown in Fig. 5, the highest MPO activity was recorded in standard group ($279.80 \pm 13.21 \text{ U}/\text{mg}$ protein) on the 14th day, surpassing the other groups. On the other hand, in groups III and IV, MPO activity (52.24 ± 18.82 and $60.22 \pm 2.67 \text{ U}/\text{mg}$ protein, respectively) was significantly ($p < 0.05$) reduced, with respect to that of groups I ($127.35 \pm 19.00 \text{ U}/\text{mg}$ protein), and V ($177.41 \pm 25.59 \text{ U}/\text{mg}$ protein). Following 20 days of treatment, a decline in MPO activity was observed in all groups, particularly in groups III and IV (2.21 ± 1.01 and $2.13 \pm 0.75 \text{ U}/\text{mg}$ protein, respectively), in comparison to standard ($6.62 \pm 2.06 \text{ U}/\text{mg}$ protein) and control ($14.32 \pm 3.21 \text{ U}/\text{mg}$ protein).

3.5.2.4. Estimation of antioxidant enzymes. In order to investigate the *in vivo* antioxidant defenses in the control, standard and treated groups, CAT and SOD activities were assessed. The results showed that, after 14 days of treatment, the excision wound induced a repression of CAT activity ($0.021 \pm 0.001 \text{ U}/\text{mg}$ protein) in group I (Fig. 6). On the other hand, treatment with both standard and ointments (10 and 20 %) led to an enhancement ($p < 0.001$) in catalase levels (0.074 ± 0.003 , 0.101 ± 0.001 , $0.086 \pm 0.003 \text{ U}/\text{mg}$ protein respectively). Similarly, after 20 days of treatment, CAT levels ($0.058 \pm 0.004 \text{ U}/\text{mg}$ protein) were low in group I, in contrast to those in groups II, III and IV which were drastically ($p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.05$) increased (0.087 ± 0.007 , 0.102 ± 0.005 , $0.085 \pm 0.004 \text{ U}/\text{mg}$ protein respectively), especially in group III.

Obtained data indicated that after 14 days, the lowest SOD activities were observed in skin tissues of groups I and V (180.27 ± 6.40 and

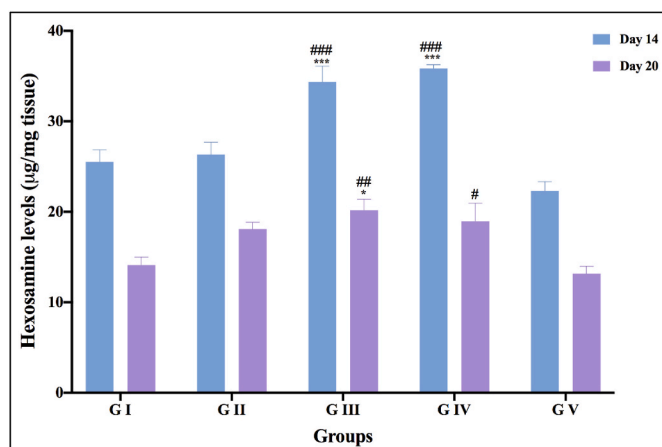


Fig. 4. Hexosamine levels ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue) in different groups on days 14 and 20 after wounding. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 5). (GI: control group with untreated excision, GII: treated with standard, GIII: treated with ointment 10 %, GIV: treated with ointment 20 %, GV: control group treated with excipient). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was used for statistical significance. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to group I on day 14 or on day 20 and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared to group V.

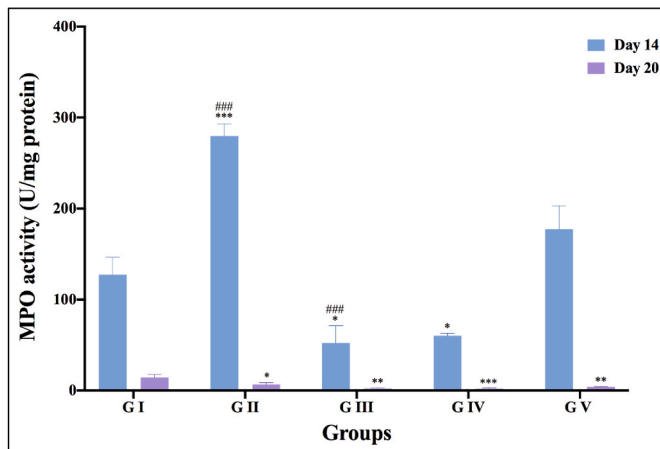


Fig. 5. Myeloperoxidase activity (U/mg protein) in different groups on days 14 and 20 after wounding. Results are expressed as mean ± SEM (n = 5). (G I: control group with untreated excision, G II: treated with standard, G III: treated with ointment 10 %, G IV: treated with ointment 20 %, G V: control group treated with excipient). One-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test was used for statistical significance. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared to group I on day 14 or on day 20 and #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared to group V.

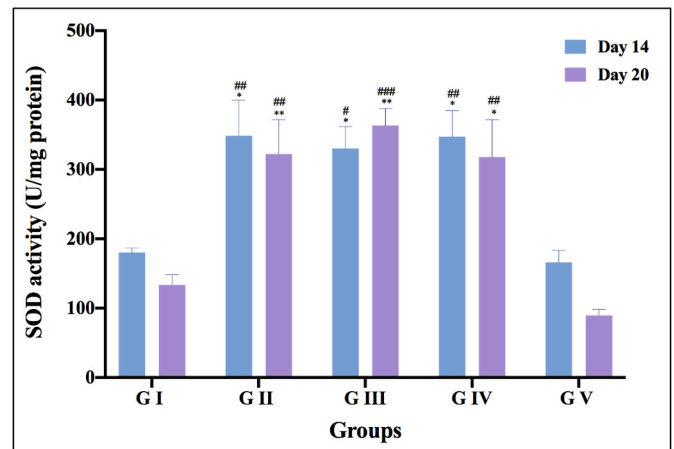


Fig. 7. Superoxide dismutase activity (U/mg protein) in different groups on days 14 and 20 after wounding. Results are expressed as mean ± SEM (n = 5). (G I: control group with untreated excision, G II: treated with standard, G III: treated with ointment 10 %, G IV: treated with ointment 20 %, G V: control group treated with excipient). One-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test was used for statistical significance. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared to group I on day 14 or on day 20 and #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared to group V.

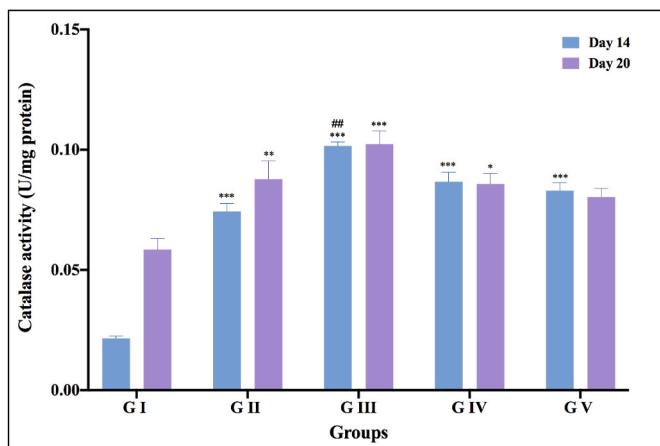


Fig. 6. Catalase activity (U/mg protein) in different groups on days 14 and 20 after wounding. Results are expressed as mean ± SEM (n = 5). (G I: control group with untreated excision, G II: treated with standard, G III: treated with ointment 10 %, G IV: treated with ointment 20 %, G V: control group treated with excipient). One-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test was used for statistical significance. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared to group I on day 14 or on day 20 and #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared to group V.

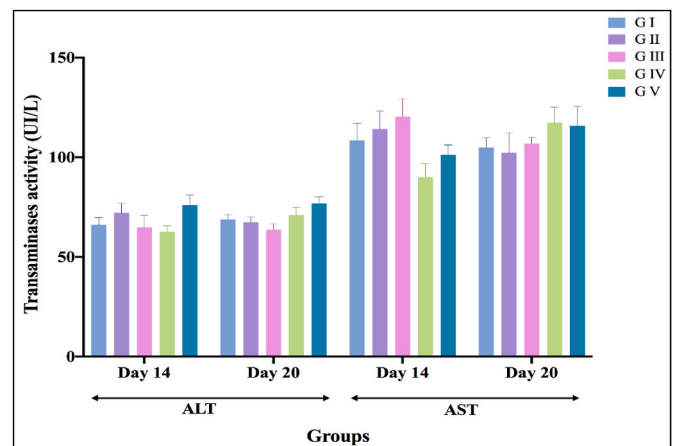


Fig. 8. Transaminases activity (UI/L) in different groups on days 14 and 20 after wounding. Results are expressed as mean ± SEM (n = 5). (G I: control group with untreated excision, G II: treated with standard, G III: treated with ointment 10 %, G IV: treated with ointment 20 %, G V: control group treated with excipient, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase). One-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test was used for statistical significance.

166.01 ± 17.43 U/mg protein, respectively), compared to groups II, III and IV. In these groups, SOD activity was boosted significantly (*p* < 0.05) (348.27 ± 51.13, 330.41 ± 31.47 and 347.09 ± 37.91 U/mg protein) by respective treatments with standard and ointments 10 and 20 % (Fig. 7). Similarly, 20 days post-wounding, a significant (*p* < 0.01 and *p* < 0.05) increase in SOD activity was noticed in rats treated with standard, ointments 10 and 20 % with respective values of 322.16 ± 49.63, 363.34 ± 24.37 and 317.82 ± 53.83 U/mg protein compared to group I, while no significant difference was found between groups I and V.

3.5.3. Estimation of transaminases levels in blood

The results illustrated in Fig. 8 indicate that in groups I and V, 14 days post-wounding, the serum liver enzyme values of ALT and AST

were found to be 66.12 ± 3.52, 76.00 ± 4.98 and 108.50 ± 8.53, 101.25 ± 4.93 UI/L, respectively, which did not change significantly after 20 days (68.75 ± 2.50, 76.83 ± 3.24 and 104.91 ± 5.01, 115.83 ± 9.76 UI/L, respectively). Similarly, the transaminase levels were not altered by various topical applications (standard, ointment 10 and 20 %) over the course of 14 and 20 days.

3.5.4. Histological analyses

The microscopic analysis of tissue samples taken from the skins of the various groups is shown in Fig. 9. The results indicated that following the 14th days of treatment, control groups I and V showed infiltration of inflammatory cells with an incomplete re-epithelialization (Fig. 9a1, e1), giving rise, after 20 days, to a newly formed epithelium thinner than that of the other groups. Similarly, the analysis of skin tissue sections from animals in group II after 14 days of treatment revealed neutrophil

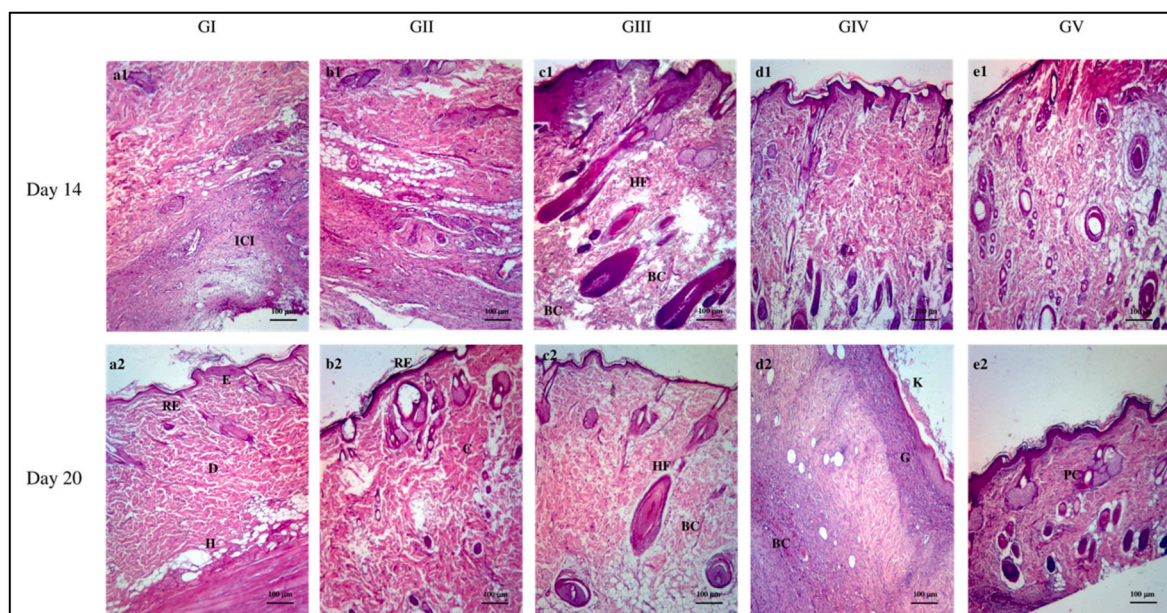


Fig. 9. Histological dermal sections stained with hematoxylin-eosin dye $\times 400$ magnifications, on days 14 (a1-e1) and 20 (a2-e2) after wounding. (GI: control group with untreated excision, GII: treated with standard, GIII: treated with ointment 10 %, GIV: treated with ointment 20 %, GV: control group treated with excipient, E: epidermis, D: dermis, H: hypodermis, RE: re-epithelialization, ICI: infiltration of inflammatory cells, C: collagen, BC: blood capillary, HF: hair follicle, K: keratinization, G: granulation tissue, PC: pacinian corpuscle).

infiltration as an early sign of inflammation and an incomplete dermal layer. After 20 days of treatment, a large number of hair follicles and arterioles was observed, indicating the onset of a neo-angiogenesis process. On the other hand, in both groups treated with ointments 10 and 20 %, the dermal layer had a regular morphology with fibroblastic and vascular proliferation (Fig. 9c2, d2), in addition to the presence of hair follicles with very few inflammatory cells. It is noteworthy to mention that collagen regeneration was evident in all the groups, namely on the 20th day post-wound, in groups treated with the standard and ointments compared to group I (Fig. 9b2, c2, d2).

3.6. Identification of bioactive compounds by HPLC-MS analysis

The compounds identified in the ethanolic extract of *P. nigra* flower buds are presented in Table 5 and can be divided into different classes: phenolic acids (ferulic acid, coumaric acid, cinnamic acid, vanillin), flavonoids (catechin, myricetin, hesperidin, rutin) and coumarins (4-hydroxycoumarin, esculin hydrate).

4. Discussion

Medicinal plants harbor phenolic compounds with inherent antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial properties that would contribute to wound management, by enhancing the regeneration of lost

tissue through the modulation of one or more phases of the wound healing process (Pattnaik et al., 2023). The aim of this study was to elaborate a formulation based on *P. nigra* flower buds that would attenuate inflammation and promote dermal wound healing in an excision rat model.

The phenolic substance concentrations are generally influenced by the method of extraction, nature of solvent, solid:solvent ratio, climatic conditions, the harvesting region and the plant part (Dai and Mumper, 2010). These factors explain the discrepancies in our results when compared to those obtained previously (Debbache-Benaïda et al., 2013; Debbache-Benaïda et al., 2018). In the current study, the ultrasound-assisted extraction resulted in a greater amount of total phenol content (89.55 ± 7.76 mg CFAE/gE) compared to the traditional maceration procedure, which had an estimated total phenol content of 51.78 ± 4.56 mg CAE/gE (Debbache-Benaïda et al., 2013). On the other hand, and in full agreement with our results, a similar amount of total phenols (95.02 ± 1.93 mg CAE/g), obtained through an ultrasound-assisted extraction, was reported in Lithuanian *P. nigra* buds (Stanciauskaite et al., 2021). Regarding flavonoid content, our findings (14.05 ± 0.36 mg QueE/g of extract) are comparable to those previously reported (13.67 ± 0.34 mg QueE/gE) (Debbache et al., 2014), but higher than the levels recorded in both bark and wood extracts of poplar (Ostolski et al., 2021). The investigation conducted on *P. nigra* from Lithuania has concluded that ethanol, at 70 % was the most suitable

Table 5

Phenolic compounds identified in the ethanolic extract of *P. nigra* flower buds with UPLC-ESI-MS/MS.

Number	RT(min)	Compound Name	Molecular formula	Molecular weight (g/mol)	Ionization mode	Transition M/Z	Area (%)
1	4.036	4-hydroxycoumarin	C9H6O3	162.14	(-)	160.8000 > 117.1000	0.020
2	9.05	Vanillin	C8H8O3	152.15	(+)	153.1000 > 65.1500	1.015
3	12.686	Catechin	C15H14O6	290.27	(+)	291.1000 > 123.0500	2.054
4	13.551	Curcumin	C21H20O6	368.4	(+)	369.0000 > 177.0000	0.068
5	15.386	Ferulic acid	C10H10O4	194.18	(+)	194.9000 > 177.1500	0.429
6	17.253	Myricetin	C15H10O8	318.23	(+NH4+)	336.2500 > 72.1500	0.066
7	17.636	Esculin hydrate	C15H18O10	358.3	(+)	359.1000 > 295.1500	3.957
8	17.640	Hesperitin	C16H14O6	302.28	(-)	300.9000 > 255.2500	0.082
9	19.457	Rutin	C27H30O16	610.5	(+)	611.2000 > 73.2000	3.358
10	20.137	<i>p</i> -Coumaric acid	C9H8O3	164.16	(+)	165.1000 > 101.2000	1.201
11	20.286	Cinnamic acid	C9H8O2	148.16	(+)	149.0500 > 84.7500	85.719

solvent for the extraction of the phenolic compounds in this plant (Stanciauskaite et al., 2021). Nevertheless, according to Bondar et al. (2020), more flavonoids (82.60 %) were recovered when using ethanol at 96 %, in contrast to a higher content of hydroxycinnamic acids (57.70 %), extracted with 70 % ethanol. Antioxidant activity was assessed using two techniques with different underlying mechanisms. The *in vitro* antioxidant activity of the ethanolic extract of *P. nigra* flower buds was studied using DPPH radical scavenging and β -carotene bleaching. The results indicated that the ethanolic extract of *P. nigra* flower buds showed a strong antioxidant activity, in accordance with recent studies, which reported potent antioxidant effects of phytoconstituents from various *Populus* species and propolis on DPPH scavenging and β -carotene bleaching activities (Ostolski et al., 2021; Pannucci et al., 2021; Stanciauskaite et al., 2021). The DPPH radical scavenging activity of the extract (IC_{50} : 42.39 ± 2.42 μ g/mL) was found to be higher than that of a traditionally used wound healing plant, *Alhagi maurorum* (IC_{50} : 214 μ g/mL) (Bai et al., 2021). Nanoformulations made from other plant extracts such as *Rhus coriaria* (IC_{50} : 196 μ g/mL) (Liu et al., 2020), *Lens culinaris* (IC_{50} : 203 μ g/mL) (Ahmeda et al., 2020a) and *Camellia sinensis* (IC_{50} : 125 μ g/mL) (Ahmeda et al., 2020b) have also shown weaker antioxidant activities, with regards to DPPH scavenging activity. Indeed, the efficiency of the extract against DPPH reveals a strong reducing capacity, demonstrating an abundance of hydroxylated phytoconstituents in the extract (Dai and Mumper, 2010). On the other hand, the most interesting outcome concerns the β -carotene bleaching test, which unveiled a high protective potential of *P. nigra* buds against lipid peroxidation, equivalent to that of the standard, caffeic acid. This specific antioxidant activity has not been previously investigated on *P. nigra* from Algeria, but is in agreement with previous studies (86.13 ± 1.20 %) on Algerian *Populus tremula* (Krimat et al., 2014). This is highly pertinent as it underscores the extract's ability to counteract lipid peroxidation, thereby preserving the integrity of the scarred skin.

The inflammatory stage is critical to the healing process, since it prevents infection. Excessive inflammation will prevent the passage to the proliferative phase, thus leading to the emergence of a chronic wound, and a delay in wound healing. The anti-inflammatory activity of poplar ethanolic extract was assessed through NO^{\cdot} scavenging, anti-trypsin activity, in addition to COX-1 and LOX inhibition. Nitric oxide radical (NO^{\cdot}) is considered a pro-inflammatory mediator, acting as an important transmembrane molecular signal during the inflammatory process (Papi et al., 2019). Furthermore, when produced in excess, NO^{\cdot} may cause tissue injury by generating the toxic $ONOO^-$ radical (Weidinger and Kozlov, 2015). Therefore, the NO^{\cdot} scavenging efficiency of the extract, which is comparable to that of the standard caffeic acid, is of high relevance. The anti-trypsin activity of the extract is estimated to be moderate, when compared to caffeic acid. However, it serves as an indicator of the extract's ability to inhibit proteases (like elastase and collagenase), generally produced by neutrophils, thereby preventing excessive tissue inflammation and damage. This inhibition promotes the production of growth factors and the regeneration of the extracellular matrix (Siwicki and Kubes, 2023). An earlier study (Shahwar et al., 2012) demonstrated the inhibitory power of several phenolic compounds on trypsin, mainly caffeic acid with 85 % inhibition.

The anti-inflammatory character of the studied extract is substantiated by its inhibition of COX-1 and LOX, exhibiting higher potency on the first enzyme, equivalent to that of gallic acid. At the cellular level, both enzymes metabolize arachidonic acid to generate prostaglandins (PGs) and leukotrienes (LTs), which are implicated in cutaneous inflammation (Yasukawa et al., 2020). Our findings are corroborated by a study that reported the inhibitory action of flavanones from black poplar extract on pro-inflammatory enzymes, suppressing the production of inflammatory cytokines and the blocking of the activation of TNF- α (Wang et al., 2014). Another extensive report (Poblocka-Olech et al., 2018) has demonstrated the anti-inflammatory potential of different *Populus* species, including *P. nigra*, through the reduction of the production of interleukins in HGF-1 cell lines, attributed to the

presence of a high amount of flavonoids, especially pinostrobin and pinocembrin. The latter acts as a regulator of interleukin release both *in vitro* and *in vivo* (Soromou et al., 2012). The *in vitro* inhibitory effects on trypsin, COX and LOX activities is indicative of the anti-inflammatory potency of the *P. nigra* extract. *In vivo*, these pro-inflammatory enzymes are under the control of key signaling pathways, which regulate the expression of pro-inflammatory cytokines (interleukins and TNF- α) (Pattnaik et al., 2023). The above mentioned studies (Soromou et al., 2012; Wang et al., 2014; Poblocka-Olech et al., 2018) highlight the implication of *P. nigra* extracts and other *Populus* species in the modulation of the inflammatory response, thus paving the way for the onset of the proliferative phase and the continuation of the healing process. Conversely, if uncontrolled, the inflammation would be prolonged, thus plunging the wound into a chronic phase and undermining wound repair.

Therefore, the anti-inflammatory potency of the extract has contributed to the wound healing process *in vivo* by attenuating the inflammation. Indeed, the topical application of both ointments (10 and 20 %) substantially promoted the cicatrization in rats, as reflected by faster wound contraction compared to the control groups. Wound healing is an intricate mechanism that replaces dead tissue by new vital tissue (Wilkinson and Hardman, 2020). The skin excision elicited the onset of an inflammation, which was attenuated faster in the test groups, as evidenced by the macroscopic and microscopic observations, as well as the results of anti-MPO activity in the skin tissues of the different groups. Moreover, the extract significantly repressed MPO activity in the test groups on the 14th day, and this repression was significantly accentuated on the 20th day, surpassing that of the other groups. In particular, the standard drug madecassol showed a weak inhibitory capacity on MPO, disclosing a lack of anti-inflammatory potential. Our study correlates with previous investigations on different medicinal plants, which are known to be a rich source of bioactive molecules with skin regenerative potential (Pattnaik et al., 2023). Our findings have demonstrated that *P. nigra* flower buds extract is a rich source of tannins, which may contribute to wound closure by enhancing the formation of capillary vessels (Li et al., 2011). Essential oil constituents of *Populus alba*, a related species, have shown an efficient wound healing potential in a burn wound model in rats (Belkhodja et al., 2020). Furthermore, Wang et al. (2014) demonstrated that the ethanolic extract of *P. nigra* had potent anti-inflammatory effects by inhibiting the production of inflammatory cytokines (IL-6, IL-10 and TNF- α) in acute lung injury in mice.

An upgraded activity of the antioxidant biomarker enzymes, SOD and CAT, was observed in scarred tissues of the test groups (14 days) compared to the other groups, highlighting the improvement of the redox state of the wound tissue. This improvement prevents the formation of noxious ROS species, which are produced extensively by activated macrophages and neutrophils during the inflammatory phase of skin injury. Although the production of ROS by MPO is beneficial for fighting microbial invasion of the wound site, it induces cytotoxicity and exacerbates inflammation, thereby undermining the healing process (Raziyeva et al., 2021).

During the wound healing process, the imminent risk of bacterial infection leads to the release of proteolytic enzymes, which degrade the connective tissue of the skin, thereby disrupting the wound repair mechanism. The most common bacteria associated with wound infection include *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus* and *Escherichia coli* (Pattnaik et al., 2023) against which *P. nigra* ethanolic extract has been proven effective. Our findings are supported by previous reports on the antibacterial potency of *P. nigra* (Debbache et al., 2014; Boumghar et al., 2019; Stanciauskaite et al., 2021). The petroleum jelly incorporated in the formula and used as an excipient seals water into the skin, thus contributing to the prevention of microbial growth (Kamrani et al., 2023). It equally plays a pivotal role in the wound healing process, by creating the necessary moisture environment for epithelialization, which occurs about 40 % faster than in a dry environment.

On the other hand, the ointment, at both concentrations, 10 and 20 %, was found to be safe and devoid of any toxicity, as revealed by unaltered transaminase levels in the blood. Additionally, no deaths or signs of toxicity such as trembling, weight loss or diarrhea were observed in the experimental animals, in agreement with a previous study conducted by Debbache et al. (2014). Moreover, cytotoxicity tests carried out on HEK 293 cells (Wang et al., 2014) and reconstructed human epidermis (Maack and Pegard, 2016), as well as skin irritation assessed in mice (Zaidi et al., 2023), have substantiated the lack of toxicity of *P. nigra* flower buds extracts. These findings are corroborated by a Food and Drug Administration Journal publication, which states that *P. nigra* is a safe non-toxic plant (European Food Safety Authority, 2012).

The histological analysis of studied tissue sections from the test groups revealed a build-up of collagen fibers, indicating fibroblast proliferation, thus favoring faster wound closure and re-epithelialization. The synthesis of high levels of hydroxyproline and hexosamine in the test groups provides strength to the repaired tissue and stimulates healing (Bodas and Shinde, 2021). The presence of the highest levels of hydroxyproline, an important component of collagen, in the post-wound tissue after 14 days of treatment with the *P. nigra* extract ointment (10 %) is an indicator of tissue regeneration. On the other hand, a decline in hydroxyproline levels after 20 days is directly associated with collagen turnover (Pattnaik et al., 2023). Hexosamine is synthesized by fibroblasts to stabilize the collagen molecules by enhancing electrostatic and ionic interactions (Bodas and Shinde, 2021). Therefore, it is involved in the formation of the new extracellular matrix. The obtained results revealed that the topical application of *P. nigra* ointments (10 and 20 %) induced an increase in hexosamine levels during the first 14 days, which was however attenuated during the following days, suggesting that the regeneration phase ended within the first 14 days. Furthermore, microscopic analysis indicated that the ointment stimulated hair follicle regrowth and vascularization in the healing site. These morphological changes were mostly manifested in the initial days following tissue injury. On the other hand, the standard drug (madecassol) stimulated hydroxyproline production but failed to boost hexosamine levels, which explains its lower wound healing efficiency, when compared to the test groups. Madecassol is a drug formula that combines *Centella asiatica* extract with lavender and geranium essential oils, which are known for their wound healing attributes and stimulation of collagen production (Happy et al., 2021). However, our findings showed that this drug lacked intrinsic anti-inflammatory potential.

The wound healing potential of the *P. nigra* ointment used in the present study appears to be comparable to that of a previously tested copper nanoparticle-based ointment containing *Allium eriophyllum* Boiss leaf aqueous extract (Zhao et al., 2022), where the wound contraction percentage was found to be 72 ± 3 on day 10 post-wounding. In another study, Pathak and Gadgoli (2024) investigated the wound healing potential of Yashad bhasma, a traditional herbal-mineral mixture containing zinc, on excision wound models in albino rats over 20 days. According to the percentage of wound contraction, the herbomineral ointment showed 100 % healing and was found to be more effective than the reference drug betadine.

In relation to wound healing, most studies on *P. nigra* have demonstrated the beneficial effects of its extracts on the skin, making its use in the cosmetic industry an interesting prospect. Dudonné et al. (2011) demonstrated that poplar bud aqueous extract exhibited a potent effect on both skin aging and cell regeneration regulation. Strong tyrosinase inhibitory activity of *P. nigra* ethanolic extract suggests a promising lightening effect on human skin (Maack and Pegard, 2016). Likewise, a recent study conducted by Zaidi et al. (2023) on *Populus nigra* flower buds lactic acid extract, showed a fairly good photoprotective activity on mouse skin against solar radiation (UVB).

The HPLC-MS analysis conducted in the current study disclosed the presence of phenolic compounds in *P. nigra*, identified by comparing their retention time and mass spectra with known standards from an existing database. The most abundant molecules were phenolic acids,

mainly cinnamic, coumaric and ferulic acids, in full agreement with previous reports (Dudonné et al., 2011; Stanciauskaite et al., 2021). These compounds contribute considerably to wound contraction and re-epithelialization processes by stimulating growth, differentiation, migration of dermal fibroblasts, and neovascularization (Melguizo-Rodríguez et al., 2021). The strong antioxidant activity of the analyzed extract may be attributed to the presence of hydroxylated flavonols, such as rutin and myricetin. Previously, *p*-coumaric acid has been described as a major antioxidant compound in *P. nigra* buds extract from Romania (Dudonné et al., 2011). Our results are in strong agreement with a previous report that detected vanillin and hydroxycoumarins in *P. nigra* from Lithuania (Stanciauskaite et al., 2021). The identification of esculin in the analyzed extract is unprecedented and supported by the recent finding of the presence of esculetin, a derivative of esculin in Algerian *P. nigra* flower buds extract (Zaidi et al., 2023). Esculin is primarily an anti-inflammatory lead compound, abundant in the bark of Fraxinus species (Ahmane et al., 2019). On the other hand, our results are consistent with previously published results (Boumghar et al., 2019), which revealed the absence of caffeic acid and quercetin in *P. nigra* from Algeria.

5. Conclusion

In the present work, we have revealed the *in vivo* wound healing potential of a *P. nigra* flower buds-based ointment, made of a combination of an eco-friendly solvent, ethanol, and an excellent excipient for topical application, vaseline. The 10 % ointment formula was found to be optimal, promoting high wound contraction (97.37 %) and re-epithelialization, thus leading to swift healing of excisional wounds in rats. The high therapeutic efficiency of the ointment may be attributed to the potent antioxidant activity, revealed by the DPPH and beta-carotene tests, and the up-regulation of CAT and SOD activities in rat skin tissue, which helped in eliminating ROS, thus preventing the exacerbation of inflammation. The inhibition of MPO in skin tissue, associated with *in vitro* anti-COX and anti-LOX effects of *P. nigra* extract, contributed to the anti-inflammatory activity of the ointment. The pharmacological attributes of *P. nigra* buds-based formula are undoubtedly due to the presence of bioactive compounds, such as cinnamic, ferulic and *p*-coumaric acids, rutin, myricetin and esculin, which were revealed by LC-MS analysis, making it a promising alternative to synthetic drugs. This unique therapeutic effect may also be used in the treatment of other diseases such as rheumatism, arthritis, bronchitis, burns, and hemorrhoids for which *P. nigra* is a traditional remedy. The results obtained provide scientific evidence for the traditional use of *P. nigra* in cicatrization. Therefore, the developed formula can be used as a new therapeutic effective drug for inflammation and skin healing. Ongoing research aims at achieving a detailed insight into the mechanisms of *P. nigra* phytoconstituents in wound healing.

Funding

This work was supported by a grant (N°01/Univ-Bejaia/DGRSDT) from the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria.

CRediT authorship contribution statement

Amina Atia: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Dina Atmani-Kilani:** Visualization, Validation, Supervision. **Djebbar Atmani:** Validation, Conceptualization. **Karima Ayouni:** Supervision, Investigation. **Sarra Belkhir:** Methodology, Investigation. **Malika Benloukil:** Investigation. **Naima Saidene:** Investigation, Data curation, Conceptualization. **Kenza Moulaoui:** Methodology, Investigation. **Souad Kasmi:** Methodology, Investigation. **Zineb Medjahed:** Investigation. **Walid Boussebaa:** Investigation.

Djamila Atmani: Investigation.

Declaration of competing interest

I, Amina ATIA, declare that this manuscript is original, unpublished, that there are no plans to publish it elsewhere, and that there are no conflicts of interest to disclose.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We would like to thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for funding the experiments conducted in the Laboratory of Applied Biochemistry. We wish to express our gratitude to Dr. Moualek F., the director of the laboratory of medical analysis for his precious help in providing technical assistance.

References

- Abdelouhab, K., Guemaz, T., Karamac, M., Kati, D.E., Amarowicz, R., Arrar, L., 2023. Phenolic composition and correlation with antioxidant properties of various organic fractions from *Hertia cheirifolia* extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 235, 115673 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115673>.
- Abd Ghafar, S.Z., Mediani, A., Maulidiani, Ramli, N.S., Abas, F., 2018. Antioxidant, α -glucosidase, and nitric oxide inhibitory activities of *Phyllanthus acidus* and LC-MS/MS profile of the active extract. *Food Biosci.* 25, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.009>.
- Afsar, T., Razak, S., Khan, M.R., Mawash, S., Almajwal, A., Shabir, M., Haq, I.U., 2016. Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydasypica* R. Parker aerial parts. *BMC Compl. Alternative Med.* 16 (1). <http://doi:10.1186/s12906-016-1240-8>.
- Ahmeda, A., Zangeneh, M.M., Zangeneh, A., 2020a. Green formulation and chemical characterization of *Lens culinaris* seed aqueous extract conjugated gold nanoparticles for the treatment of acute myeloid leukemia in comparison to mitoxantrone in a leukemic mouse model. *Appl. Organomet. Chem.* 34 (3), e5369 <https://doi.org/10.1002/aoc.5369>.
- Ahmeda, A., Zangeneh, A., Zangeneh, M.M., 2020b. Green synthesis and chemical characterization of gold nanoparticle synthesized using *Camellia sinensis* leaf aqueous extract for the treatment of acute myeloid leukemia in comparison to daunorubicin in a leukemic mouse model. *Appl. Organomet. Chem.* 34 (3), e5290 <https://doi.org/10.1002/aoc.5290>.
- Ahmane, N., Atmani-Kilani, D., Chaher, N., Ayouni, K., Rahmani-Berboucha, M., Dacosta, G., Debbache-Benaid, N., Richard, T., Atmani, D., 2019. Identification of bioactive compounds from *Fraxinus angustifolia* extracts with anti-NADH oxidase activity of bovine milk xanthine oxidoreductase. *Turk. J. Biol.* 43, 133–147. <https://doi:0.3906/biy-1810-26>.
- Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiqzaman, M., 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceut. J.* 21 (2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.sjps.2012.05.002>.
- Bai, J., Gongsun, X., Xue, L., Zangeneh, M.M., 2021. Introducing a modern chemotherapeutic drug formulated by iron nanoparticles for the treatment of human lung cancer. *J. Exp. Nanosci.* 16 (1), 397–409. <https://doi.org/10.1080/17458080.2021.1998460>.
- Begashaw, B., Mishra, B., Tsegaw, A., Shewamene, Z., 2017. Methanol leaves extract *Hibiscus micranthus* Linn exhibited antibacterial and wound healing activities. *BMC Compl. Alternative Med.* 17, 337. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1841-x>.
- Belkhir, S., Debbache-Benaid, N., Medjahed, Z., Atia, A., Ayouni, K., Boudjouan, F., Saidene, N., Benamrouche, N., Duma, F., Atmani-Kilani, D., 2024. Interaction of *Clematis flammula* extracts with membrane models: characterization of anti-inflammatory and antibacterial activities. *Plant Biosyst.* 158 (1), 130–141. <https://doi.org/10.1080/11263504.2023.2293025>.
- Belkhdja, H., Meddah, B., Meddah Tir Touil, A., Bouhadi, D., Belmimoun, A., 2020. Wound healing activity of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba* in a burn wound model in rats. *SAR J. Pathol. Microbiol.* 1, 1–9. <https://doi.org/10.36346/sarjpm.2020.v01i01.001>.
- Bodas, K., Shinde, V., 2021. Healing of wounds: a detailed review on models, biomarkers, biochemical and other wound assessment parameters. *Int. J. All Res. Educ. Sci. Methods* 9 (3), 2069–2085. ISSN : 2455-6211.
- Bondar, A., Gubar, S., Smielova, N., Shyteyeva, T., Tkachenko, O., Kryvoruchko, L., Karpenko, K., Georgiyants, V., 2020. Technological aspects of obtaining liquid extracts of black poplar buds and determining the strategy for their standardization at the pharmaceutical development stage. *Sci. Pharm. Sci.* 10–16 <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2020.197270>.
- Boumghar, N., Behidj, N., Ksouri, R., 2019. Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria). *Braz. J. Pharm. Sci.* 55, 18114 <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000218114>.
- Cañedo-Dorantes, L., Cañedo-Ayala, M., 2019. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *Int. J. Inflamm.* 3706315 <https://doi.org/10.1155/2019/3706315>.
- Cialdai, F., Risaliti, C., Monici, M., 2022. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 958381 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.958381>.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: extraction, Analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- Debbache-Benaid, N., Atmani-Kilani, D., Schini-Keirth, B., Djebbli, N., Atmani, D., 2013. Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 697–704. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60141-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60141-0).
- Debbache, N., Atmani, D., Atmani, D., 2014. Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Ind. Crops Prod.* 53, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.018>.
- Debbache-Benaid, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Nassima, C., Djebbli, N., Boudaoud, H., Atmani, D., 2018. Anti-hyperuricemic and neuroprotective effects of *Populus nigra* L. (Salicaceae) flower buds used in Algerian folk medicine. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 6, 471–482. <http://jppres.com/jppres>.
- Dehnoe, A., Javad Kalbasi, R., Zangeneh, M.M., Delnavazi, M.R., Zangeneh, A., 2023a. Characterization, anti-lung cancer activity, and cytotoxicity of bio-synthesized copper nanoparticles by *Thymus fedtschenkoii* leaf extract. *J. Cluster Sci.* 1–12 <https://doi.org/10.1007/s10876-023-02512-w>.
- Dehnoe, A., Javad Kalbasi, R., Zangeneh, M.M., Delnavazi, M.R., Zangeneh, A., 2023b. One-step synthesis of silver nanostructures using *Heracleum persicum* fruit extract, their cytotoxic activity, anti-cancer and anti-oxidant activities. *Micro & Nano Lett.* 18 (1), e12153 <https://doi.org/10.1049/mna2.12153>.
- Dudonné, S., Poupard, P., Coutière, P., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J.M., Vitrac, X., 2011. Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4527–4536. <https://doi.org/10.1021/jf104791t>.
- Dwivedi, D., Dwivedi, M., Malviya, S., Singh, V., 2016. Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. *J. Tradit. Complement. Med.* 7, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2015.12.002>.
- Ernest, D., Foutse, Y., Stéphanie, M.K., Théophile, D., 2019. Activité cicatrisante d'une pommade à base des feuilles de *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw chez le rat. *IJRAR* 6 (4), 158–178. <http://www.ijrar.org/IJRAR19S1020.pdf>.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Parma, Italy. EFSA J. 10 (5), 2663.
- Guleria, I., Kumari, A., Lacaille-Dubois, M.A., Nishant, Kumar, V., Saini, A.K., Dhatwalia, J., Lal, S., 2021. A review on the genus *Populus*: a potential source of biologically active compounds. *Phytochemistry Rev.* 1–60. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09772-2>.
- Happy, A.A., Jahan, F., Momen, M.A., 2021. Essential oils: magical ingredients for skin care. *J. Plant Sci.* 9 (2), 54–64. <https://doi:10.11648/j.jps.20210902.14>.
- Kamrani, P., Hedrick, J., Marks, J.G., Zaenglein, A.L., 2023. Petroleum jelly: a comprehensive review of its history, uses, and safety. *J. Am. Acad. Dermatol.* 23, 01107 <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2023.06.010>.
- Karim, N., Khan, I., Khan, W., Khan, I., Khan, A., Halim, S.A., Khan, H., Hussain, J., Al-Harrasi, A., 2019. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Asparagus A* involve selective cyclooxygenase 2 and inflammatory cytokines Inhibition: an *in-vitro*, *in-vivo*, and *in-silico* approach. *Front. Immunol.* 10 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00581>.
- Krimat, S., Dob, T., Lamari, L., Boumeridja, S., Chelghoum, C., Metidji, H., 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *J. Coast. Life Med.* 2, 478–483. <https://doi.org/10.12980/JCLM.2.2014APJTB-2014-0071>.
- Leelaprakash, G., Dass, S., 2011. *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Encicostemma Axillare*. *Medicine Environ. Sc.* 3, 189–196. ID: 44834746.
- Li, K., Diao, Y., Zhang, H., Wang, S., Zhang, Z., Yu, B., Huang, S., Yang, H., 2011. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. *BMC Compl. Alternative Med.* 11, 86. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-86>.
- Liu, J., Zangeneh, A., Zangeneh, M.M., Guo, B., 2020. Antioxidant, cytotoxicity, anti-human esophageal squamous cell carcinoma, anti-human Caucasian esophageal carcinoma, anti-adenocarcinoma of the gastroesophageal junction, and anti-distal esophageal adenocarcinoma properties of gold nanoparticles green synthesized by *Rhus coriaria* L. fruit aqueous extract. *J. Exp. Nanosci.* 15 (1), 202–216. <https://doi.org/10.1080/17458080.2020.1766675>.
- Ma, L., Ahmeda, A., Wang, K., Jalalvand, A.R., Sadrjavadi, K., Nowrozi, M., Zangeneh, A., Zangeneh, M.M., Wang, X., 2022. Introducing a novel chemotherapeutic drug formulated by iron nanoparticles for the clinical trial studies. *Appl. Organomet. Chem.* 36 (12), e5498 <https://doi.org/10.1002/aoc.5498>.
- Maack, A., Pegard, A., 2016. *Populus nigra* (Salicaceae) absolute rich in phenolic acids, phenylpropanoids and flavonoids as a new potent tyrosinase inhibitor. *Fitoterapia* 111, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.04.001>.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474. PMID: 4215654.
- Melguizo-Rodríguez, L., de Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Illescas-Montesa, R., Costela-Ruiz, V.J., García-Martínez, O., 2021. Potential effects of phenolic compounds that can be found in olive oil on wound healing. *Foods* 10, 1642. <https://doi.org/10.3390/foods10071642>.

- Merghache, D., Boucherit-Otmani, Z., El Hacı, I., Merghache, S., Chikhi, I., Boucherit, K., 2016. Antioxidant and antimicrobial activities of algerian *Populus nigra* L. buds extracts. *BIO E J.* 3 (1–2). <https://doi.org/10.5121/bioej.2016.3201>.
- Moulaoui, K., Caddeo, C., Manca, M.L., Castangia, I., Valenti, D., Escribano, E., Atmani, D., Fadda, A.M., Manconi, M., 2015. Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytoextract from *Fraxinus angustifolia*: in vitro and in vivo wound healing potential. *EJMECH* 89, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.047>.
- Muñoz, C.C., 2013. Usos medicinales del chopo negro (*Populus nigra* L.). *Medicina Natur* 7, 99–115. ISSN : 1576-3080.
- Ostolski, M., Adamczak, M., Brzozowski, B., Wiczowski, W., 2021. Antioxidant activity and chemical characteristics of supercritical CO₂ and water extracts from Willow and Poplar. *Molecules* 26 (3), 545. <https://doi.org/10.3390/molecules26030545>.
- Palacios, C.E., Nagai, A., Torres, P., Rodrigues, J.A., Salatino, A., 2021. Contents of tannins of cultivars of sorghum cultivated in Brazil, as determined by four quantification methods. *Food Chem.* 337, 127970. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127970>.
- Pannucci, E., D'Eliseo, D., Ieri, F., Romani, A., Santi, L., Bernini, R., Sabatti, M., Velotti, F., 2021. Perspectives on *Populus* spp. (Salicaceae) bud extracts as antioxidant and anti-inflammatory agents. *Nat. Prod. Res.* 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1896>.
- Papi, S., Ahmadizar, F., Hasanvand, A., 2019. The role of nitric oxide in inflammation and oxidative stress. *Immunopathol Persa* 5 (1), e08. <https://doi.org/10.15171/ipp.2019.08>.
- Pathak, P.C., Gadgoli, C.H., 2024. Exploring the efficacy of panchavalkal extract and Zinc-Copper Bhasma in promoting wound healing in incision and excision wound models in the rat. *J. Ethnopharmacol.* 320, 117404. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117404>.
- Pattanaik, S., Mohanty, S., Sahoo, S.K., Mohanty, C., 2023. A mechanistic perspective on the role of phytoconstituents-based pharmacotherapeutics and their topical formulations in chronic wound management. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 84, 104546. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104546>.
- Poblocka-Olech, L., Migas, P., Krauze-Baranowska, M., 2018. TLC determination of some flavanones in the buds of different genus *Populus* species and hybrids. *Acta Pharm.* 68, 199–210. <https://doi.org/10.2478/acph-2018-0018>.
- Pollini, L., Cossignani, L., Juan, C., Mañes, J., 2021. Extraction of phenolic compounds from fresh apple pomace by different non-conventional techniques. *Molecules* 26, 4272. <https://doi.org/10.3390/molecules26144272>.
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J., 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food Chem. Toxicol.* 45, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.08.022>.
- Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., Saparov, A., 2021. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules* 11, 700. <https://doi.org/10.3390/biom11050700>.
- Rodriguez-Palacios, A., Kodani, T., Kaydo, L., Pietropaoli, D., Corridoni, D., Howell, S., Katz, J., Xin, W., Pizarro, T.T., Cominelli, F., 2015. Stereomicroscopic 3D-pattern profiling of murine and human intestinal inflammation reveals unique structural phenotypes. *Nat. Commun.* 6 (1) <https://doi.org/10.1038/ncomms8577>.
- Rosa, A.D.S., Bandeira, L.G., Monte-Alto-Costa, A., Romana-Souza, B., 2014. Supplementation with olive oil, but not fish oil, improves cutaneous wound healing in stressed mice. *Wound Repair Regen.* 22, 537–547. <https://doi.org/10.1111/wrr.12191>.
- Shahwar, D., Raza, M.A., Shafiq-Ur-Rehman, Abbasi, M.A., Atta-Ur-Rahman, 2012. An investigation of phenolic compounds from plant sources as trypsin inhibitors. *Nat. Prod. Res.* 26, 1087–1093. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.559637>.
- Siwicki, M., Kubes, P., 2023. Neutrophils in host defense, healing, and hypersensitivity: dynamic cells within a dynamic host. *J. Allergy Clin. Immunol.* 151, 634–655. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.12.004>.
- Soromou, L.W., Chu, X., Jiang, L., Wei, M., Huo, M., Chen, N., Guan, S., Yang, X., Chen, C., Feng, H., Deng, X., 2012. *In vitro* and *in vivo* protection provided by pinocebrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *Int. Immunopharm.* 14 (1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.06.009>.
- Speroni, E., Govoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C., Guerra, M.C., 2002. Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. root extract. *J. Ethnopharmacol.* 79, 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00391-9).
- Stanciauskaite, M., Marksa, M., Liaudanskas, M., Ivanauskas, L., Ivaskiene, M., Ramanauskienė, K., 2021. Extracts of poplar buds (*Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and Lithuanian propolis: comparison of their composition and biological activities. *Plants* 10, 828. <https://doi.org/10.3390/plants10050828>.
- Wang, K., Zhang, J., Ping, S., Ma, Q., Chen, X., Xuan, H., Shi, J., Zhang, C., Hu, F., 2014. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus canadensis*). *J. Ethnopharmacol.* 155, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.037>.
- Wang, G., Ahmeda, A., Malek, Z., Mansooridara, S., Zangeneh, A., Zangeneh, M.M., 2020. Chemical characterization and therapeutic properties of *Achillea biebersteinii* leaf aqueous extract synthesized copper nanoparticles against methamphetamine-induced cell death in PC12: a study in the nanotechnology and neurology fields. *Appl. Organomet. Chem.* 34 (4), e5488. <https://doi.org/10.1002/aoc.5488>.
- Weidinger, A., Kozlov, A.V., 2015. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* 15 (5), 472–484. <https://doi.org/10.3390/biom5020472>.
- Wilkinson, H.N., Hardman, M.J., 2020. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open. Biol.* 10, 200–223. <https://doi.org/10.1098/rspb.200223>.
- Yasukawa, K., Okuno, T., Yokomizo, T., 2020. Eicosanoids in skin wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8435. <https://doi.org/10.3390/ijms21228435>.
- Zaidi, S., Benaida-Debbache, N., Medjahed, Z., Tebbi, S.O., Kadi, R., Saidene, N., 2023. A green approach for the sustainable and effective valorization from *Populus nigra* buds as a renewable source of high value-added extract using an alternative solvent with prospective application in skin care formulation. *South Afr. J. Bot.* 161, 666–677. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.08.063>.
- Zhao, H., Su, H., Ahmeda, A., Sun, Y., Li, Z., Zangeneh, M.M., Nowrozi, M., Zangeneh, A., Moradi, R., 2022. Biosynthesis of copper nanoparticles using *Allium eriophyllum* Boiss leaf aqueous extract; characterization and analysis of their antimicrobial and cutaneous wound-healing potentials. *Appl. Organomet. Chem.* 36 (12), e5587. <https://doi.org/10.1002/aoc.5587>.

Résumé

Populus nigra L. (Salicacées) est une plante médicinale dont les bourgeons floraux, riche en composés bioactifs, sont traditionnellement utilisés pour leurs vertus cicatrisantes. Bien que de nombreuses études aient porté sur les propriétés biologiques de cette plante, son activité cicatrisante demeure encore inexplorée. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une pommade contenant 10 ou 20 % d'extrait éthanolique de bourgeons floraux de *P. nigra* dans le traitement des plaies, en utilisant un modèle d'excision chez les rats. Divers paramètres ont été évalués pendant 14 et 20 jours, notamment les paramètres morphologiques, macroscopiques, histologiques et biochimiques. Les résultats de la présente étude ont démontré que l'application topique des pommades à base de *P. nigra* (10 et 20 %) sur des plaies cutanées de rats a favorisé une contraction des plaies de l'ordre de $97,37 \pm 1,19$ et $97,28 \pm 0,91$ %, respectivement, associée à une augmentation notable de l'activité des enzymes antioxydants, catalase ($0,10 \pm 0,001$; $0,08 \pm 0,003$ U/mg de protéine) et superoxyde dismutase ($363,34 \pm 24,37$; $317,82 \pm 53,83$ U/mg de protéine) dans les tissus cicatriciels. Parallèlement, une diminution de l'activité de la myéloperoxydase ($2,21 \pm 1,01$; $2,13 \pm 0,75$ U/mg de protéine) suggère un effet anti-inflammatoire prononcé. En outre, une augmentation des niveaux respectifs d'hydroxyproline ($28,05 \pm 1,20$; $25,29 \pm 1,17$ g/mg de tissu) et d'hexosamine ($20,18 \pm 1,21$; $18,95 \pm 1,98$ g/mg de tissu) a été enregistrée, reflétant une forte régénération du collagène dans le tissu cicatriciel. L'examen histologique des tissus cutanés traités avec les pommades à base de *P. nigra* a révélé des taux plus élevés de réépithélialisation, une plus faible infiltration de neutrophiles et une revascularisation par rapport au groupe témoin. Ces résultats suggèrent que *P. nigra* possède effectivement des propriétés cicatrisantes intéressantes et pourrait constituer une alternative thérapeutique prometteuse dans le traitement des plaies.

Mots-clés : *Populus nigra*, cicatrisation, pommade, collagène, inflammation.

Abstract

Populus nigra L. (Salicaceae) is a medicinal plant whose flower buds, rich in bioactive compounds, are traditionally used for their healing properties. Although numerous studies have investigated the biological properties of this plant, its healing activity remains unexplored. The main aim of this study was to assess the therapeutic potential of an ointment containing 10 or 20 % of *P. nigra* flower buds ethanolic extract in the treatment of wounds, using an excision wound model in rats. Various parameters were assessed for 14 and 20 days, including morphological, macroscopic, histological and biochemical parameters. The results of the present study demonstrated that topical application of *P. nigra*-based ointments (10 and 20 %) resulted in wound contraction of 97.37 ± 1.19 and 97.28 ± 0.91 %, respectively, associated with a significant increase in the activity of the antioxidant enzymes, catalase (0.10 ± 0.001 ; 0.08 ± 0.003 U/mg protein) and superoxide dismutase (363.34 ± 24.37 ; 317.82 ± 53.83 U/mg protein) in scar tissue. In parallel, a decrease in myeloperoxidase activity (2.21 ± 1.01 ; 2.13 ± 0.75 U/mg protein) suggests a pronounced anti-inflammatory effect. In addition, an increase in the respective levels of hydroxyproline (28.05 ± 1.20 ; 25.29 ± 1.17 g/mg tissue) and hexosamine (20.18 ± 1.21 ; 18.95 ± 1.98 g/mg tissue) was recorded, reflecting strong collagen regeneration in the scar tissue. Histological examination of skin tissue treated with *P. nigra*-based ointments revealed higher rates of re-epithelialization, lower neutrophil infiltration and revascularization compared with the control group. These results suggest that *P. nigra* does indeed possess interesting healing properties and could constitute a promising therapeutic alternative in the treatment of wounds.

Keywords: *Populus nigra*, wound healing, ointment, collagen, inflammation.

ملخص

الحور الاسود (الفصيلة الصفصافية) هو نبات طبي تستخدم براعم ازهاره الغنية بالمركبات النشطة بيولوجيا تقليديا لخصائصها العلاجية. على الرغم ان العديد من الدراسات قد بحثت في الخصائص البيولوجية لهذا النبات الا ان نشاطه العلاجي لا يزال غير مستكشف. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم الامكانيات العلاجية لمرهم يحتوي على 10 او 20% مستخلص ايثانولي من براعم زهرة الحور الاسود في علاج الجروح باستخدام نموذج استئصال الجردان. تم تقييم اعدادات مختلفة لمدة 14 و 20 يوما، بما في ذلك الاعدادات المورفولوجية والعيانية والنسجية والكيميائية الحيوية. اظهرت نتائج هذه الدراسة ان التطبيق الموضعي لمرهم الحور الاسود (10 و 20%) على جروح جلد الجردان ادى الى تقلص الجروح بنسبة 97.37 و 97.28 % على التوالي، مرتبط بزيادة كبيرة في نشاط الانزيمات المضادة للاكسدة، الكاتالاز (0.10 و 0.08 وحدة/مجم بروتين) وسوبر اكسيد ديسميوتاز (363.34 و 317.82 وحدة/مجم بروتين) في الانسجة الندبة. في موازاة ذلك، يشير انخفاض نشاط انزيم ميلوپيروكسيداز (2.21 و 2.13 وحدة/مجم بروتين) الى تأثير واضح مضاد للالتهابات. وبالإضافة الى ذلك، تم تسجيل زيادة في مستويات الهيدروكسي بروتين (28.05 و 25.29 وحدة/مجم بروتين) والهيكسوسامين (20.18 و 18.95 وحدة/مجم بروتين)، مما يعكس تجدد قويا للكولاجين في النسيج الندبي. كشف الفحص النسيجي لانسجة الجلد المعالج بمرهم الحور الاسود عن معدلات اعلى من اعادة الاندماج وانخفاض تسلل العدلات واعادة التئام الاوعية الدموية مقارنة بالمجموعة الضابطة. تشير هذه النتائج الى ان نبتة الحور الاسود تمتلك بالفعل خصائص علاجية مثيرة للاهتمام ويمكن ان تشكل بديلا علاجيا واعداد في علاج الجروح.

الكلمات المفتاحية: نبتة الحور الاسود، ندبة، مرهم، الكولاجين، الالتهاب