

**ACTIVITE ANTIINFLAMMATOIRE DE LA GRAINE DE CARAPA PROCERA
(MELIACEAE)**

**ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE SEED OF *CARAPA PROCERA*
(MELIACEAE)**

Mbaye Diaw DIOUM^a, SECK Matar^{a,*}, SY Gata Yoro^b, FAYE Joseph Mbeur^a, SARR Abdou^c, FAYE Birame^b, FAYE Babacar^b

^aLaboratoire de Chimie Organique et Thérapeutique. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontologie. Université Cheikh Anta Diop- BP 5199 Dakar-Fann. Sénégal.

^bLaboratoire de Pharmacologie. Faculté de Médecine, Pharmacie et d'odontologie. Université Cheikh Anta Diop- BP 5199 Dakar-Fann. Sénégal.

^cLaboratoire de Pharmacognosie. Faculté de Médecine, Pharmacie et d'odontologie. Université Cheikh Anta Diop- BP 5199 Dakar-Fann. Sénégal.

*Auteur Correspondant : BP 5199 Dakar-Fann. Sénégal. Email : matarsec@yahoo.fr, (221) 77 569 80 01

Résumé : le *Carapa procera* (Meliaceae) est une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle sénégalaise. Cette étude concerne l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire de la graine de *Carapa procera*. L'objectif de ce travail est non seulement de montrer l'effet de l'extrait de la graine de *Carapa procera* sur l'inflammation, mais également d'identifier les principes actifs. La méthodologie utilisée, pour évaluer l'effet anti-inflammatoire des divers extraits, est celle qui étudie *in vivo* l'évolution de l'œdème podal de rat provoquée après l'injection intraplantaire de carragénine, un agent phlogogène qui induit des foyers inflammatoires. Des rats Wistar, répartis en lots de 5, mis à jeun pendant 16 heures, ont été utilisés pour réaliser cette étude. L'étude *in vivo* des extraits apolaires et polaires, a permis de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de graine de *Carapa procera* et de le localiser dans les fractions apolaires. De plus, nous

avons pu montrer que les insaponifiables étaient responsables de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait étudié. Un bon effet anti-inflammatoire des insaponifiables, comparable à celui de l'aspirine, a été observé à 30 mg/kg.

Mots clé: *Carapa procera*, Meliaceae, insaponifiables, effet anti-inflammatoire.

Abstract: *Carapa procera* (Meliaceae) is currently used plant in Senegalese traditional medicine. This study relates to the evaluation of the anti-inflammatory effect of the seed of *Carapa procera*. The aim of this work was not only to show the effect of the seed of *Carapa procera* extract on inflammation, but also to identify the active ingredients. The experimental approach used to assess the anti-inflammatory effect of the various extracts was the evaluation of the evolution of the rat paw oedema caused by intraplantar injection of carrageenan, a

phlogogenic agent known to induce inflammatory foci. Wistar rats, divided into groups of five and fasted for 16 hours, were used for this study. The *in vivo* evaluation of the non-polar and polar extracts, allowed us to localize the anti-inflammatory effect in the non-polar fractions. Moreover, we have shown that the unsaponifiables were responsible for the anti-inflammatory effect. A significant effect of the unsaponifiable at 30 mg/kg was comparable with the effect of aspirin.

Keywords: *Carapa procera*, Meliaceae, unsaponifiables, anti-inflammatory effect.

1. INTRODUCTION

Il est bien connu que les plantes médicinales sont la source de beaucoup de principes actifs utilisés actuellement en médecine moderne. Ces principes sont surtout des métabolites secondaires, qui permettent aux organismes de se défendre face aux agressions du milieu dans lequel ils évoluent.

Le coût élevé des médicaments ainsi que des pratiques de soins issues de traditions comme de croyances en matière de santé qui impliquent l'usage de plantes à des fins médicales ont permis l'essor de la valorisation des plantes médicinales. Face aux différentes formes de résistance et aux effets indésirables, la médecine traditionnelle et les plantes médicinales constituent une alternative pour accéder à de nouveaux principes actifs. Cependant,

une mauvaise connaissance de la toxicité des plantes, une posologie non toujours maîtrisée par les tradipraticiens ainsi qu'un conditionnement non sécurisé, constituent les limites de cette médecine traditionnelle, qui est surtout pratiquée dans les pays en voie de développement.

Les travaux, que nous avons initiés sur les plantes médicinales, ont pour entre autre objets de pallier ces différents problèmes mais également de proposer des phytomédicaments plus accessibles aux populations dans les pays en voie de développement. Le principal objectif étant la recherche de nouveaux principes actifs qui pourront par la suite donner accès à de nouveaux médicaments.

Les résultats présentés dans cet article concernent une étude bioguidée de l'effet anti-inflammatoire de la graine de *Carapa procera*, une méliacée des zones tropicales et subtropicales (Kerharo J. et al., 1974). Au Sénégal, on la rencontre en Casamance. C'est un arbre dont toutes les parties sont utilisées en médecine populaire, mais très peu de travaux concernant le Carapa sont décrits dans la littérature. Cependant, quelques molécules isolées de *Carapa procera* ont été caractérisées, ce sont par exemple des tétranorterpénoïdes, le carapolide, le mexicanolide (Le Brazidec J.Y. et al., 1998 ; Vila J., et al., 1998)...

Le travail décrit ci-après s'articule en trois volets : caractérisation de l'huile de la graine par la mesure de certains indices, screening phytochimique et étude de l'effet anti-inflammatoire de la graine de *Carapa procera*.

2. MATERIEL ET METHODE

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Matériel végétal

Les graines de *Carapa procera* ont été récoltées dans la région de ZIGUINCHOR (SENEGAL), dans le village de BALINE, communauté rurale de DJINAKY. Elles ont été séchées à l'ombre avant d'être broyées dans le laboratoire de pharmacognosie de l'Université Cheikh Anta DIOP à l'aide d'un broyeur Brabender. Un échantillon de chaque partie de la plante identifiée a été déposé à l'Institut Fondamental d'Afrique Noire (IFAN).

2.1.2. Animaux

Des rats Wistar ont été utilisés pour l'étude de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de la graine de *Carapa procera* et pour l'identification bioguidée de la nature chimique des principes actifs

2.1.3. Préparation des extraits

L'action successive de l'hexane, du dichlorométhane et du méthanol (4h pour

chaque solvant) sur la poudre (285g) de graines de *Carapa procera*, est réalisée dans un extracteur Soxhlet. Après évaporation des solvants, on recueille les différents extraits. Chaque extrait est mis en suspension dans de l'eau physiologique (0,9% NaCl) à une concentration de 10mg/ml et homogénéisé en présence du détergent Tween 40, si nécessaire.

De plus, une réaction de saponification effectuée sur l'extrait hexanique de *Carapa procera* a permis d'isoler et de doser les insaponifiables et les acides gras.

2.1.4. Préparation des insaponifiables et des acides gras

Préparer une solution de soude alcoolique 0,5 N (20g/l) dans de l'éthanol. Prélever 500 ml de la solution pour saponifier 75 g d'extrait hexanique de l'huile de *Carapa procera* dans un ballon rodé muni d'un réfrigérant. Chauffer au reflux pendant une heure, puis laisser refroidir et ajouter 500ml d'eau distillée. La solution alcoolique est ensuite transvasée dans une ampoule à décanter puis extraite 4 fois par 100 ml d'hexane. Les phases hexaniques sont regroupées et lavées plusieurs fois à l'eau jusqu'à l'obtention d'une solution neutre. L'hexane est ensuite évaporé et le résidu est repris par 50 ml d'hexane puis séché sur sulfate de magnésium et

totalemment évaporé pour donner les insaponifiables.

En définitif, nous disposons de 5 extraits qui seront testés pour évaluer leur effet anti-inflammatoire. Ce sont : les insaponifiables, l'extrait hexanique, l'extrait dichlorométhanique, l'extrait méthanolique et les acides gras. Les insaponifiables sont obtenus après saponification de l'huile de la graine de *Carapa procera* alors que les acides gras sont issus de l'hydrolyse en milieu acide du savon.

2.2. Etude physicochimique et biologique des extraits de graines de *carapa procera*

2.2.1. Détermination des indices de l'huile

La détermination de l'indice de saponification, de l'indice de peroxyde ainsi que de l'indice d'acide a été effectuée selon les normes AFNOR NF T 60-206, 60204 et 60221 (AFNOR 1981).

2.2.2. Screening phytochimique

Les principales classes de métabolites secondaires, telles que : alcaloïdes, hétérosides anthracéniques, cardiotoniques, flavonoïdes et tanins ont été recherchées dans les différents extraits en utilisant les réactions de coloration classiques et la chromatographie sur couche mince

(AFNOR 1981; Rizk A.M. 1982; Garcia-Granados A. et al., 1980; Hariri E.B. et al., 1991; Lebreton P. et al., 1967)

2.2.3. Etude de l'effet anti inflammatoire

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits, nous avons utilisé une approche expérimentale préventive qui permet de suivre l'évolution de l'œdème podal induit par l'administration chez le rat de la carragénine (Winder C.Y. et al., 1958 ; Messadi J.E. 1962 ; Marcy R. 1991 ; Ndiaye M. et al., 2002 ; Ampai P. et al., 2004 ; Dongmo A.B. et al., 2003 ; Gepdiremen A. et al., 2005 ; Wei J. et al., 2003). Cette approche consiste à traiter préalablement les rats par les différents extraits, avant de créer un foyer inflammatoire et enfin de suivre comment le traitement permet de prévenir l'inflammation.

Les rats Wistar, répartis en lots de 5, ont été mis à jeun pendant 16 heures avant traitement. Chaque extrait testé a été administré *per os*, par une sonde gastrique, dans 1ml d'eau physiologique à un lot de 5 rats. Les études ont été réalisées avec tous les extraits à une dose de 100 mg/kg puis avec les extraits actifs à une dose de 30 mg/kg. Les animaux témoins ont reçu uniquement de l'eau physiologique. Aux rats du lot contrôle nous avons administré

de l'acide acétylsalicylique dosé à 100 mg/kg ou 30mg/kg, selon les expériences.

La mesure du volume initial (V_0) de la patte gauche est effectuée pour chaque rat avant l'expérience. Une heure après le gavage, une injection de 0,1ml d'une

solution de carragénine à 1% est effectuée sous le coussinet plantaire de la patte postérieure gauche des rats pour provoquer l'inflammation. Les volumes podaux sont mesurés à l'aide d'un plethysmomètre, toutes les 30 minutes pendant 240 ou 300 minutes.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Détermination des indices

Tableau I : Tableau récapitulatif des différents indices

	Extrait hexanique	Huile commerciale de la graine de <i>Carapa procera</i>
Indice d'acide	7	5,6
Indice de peroxyde	0,66	0,02
Indice de Saponification	191,45	201,96

Les indices d'acide élevés de **7** pour l'extrait hexanique et de **5,6** pour l'huile commerciale, au lieu de **1** (Lebreton P. et al., 1967), montrent un manque de stabilité de l'huile ou de mauvaises conditions de stockage.

Les deux indices de peroxyde que nous avons obtenus **0,66** pour l'extrait hexanique et **0,02** pour l'huile commerciale sont faibles et cela témoigne d'une forte résistance à l'oxydation.

Cette huile est donc caractérisée par une bonne stabilité face à l'oxydation mais une mauvaise stabilité face à la libération d'acides par hydrolyse des glycérides.

L'indice de saponification de l'extrait hexanique est de **191,45** et celui de l'huile commerciale de **201,96**. Ces valeurs sont analogues à celles décrites dans la littérature (Vila J. et al., 1998). Des valeurs similaires avaient été trouvées en République Démocratique du Congo (Old A. S. et al 1970).

La saponification effectuée a permis de déterminer une teneur en insaponifiables qui correspond à 7,8 % et une teneur en acides gras correspondant à 92,2 %.

3.2. Screening phytochimique

Le screening phytochimique des différents extraits de la graine de *Carapa procera*, à savoir l'extrait hexanique, l'extrait

dichlorométhanique, l'extrait méthanolique ainsi que de l'huile commerciale de la graine nous a permis de mettre en évidence plusieurs familles de composés. L'extrait méthanolique renferme des tanins galliques et de phlobaphènes, des alcaloïdes et des flavonoïdes. Les extraits hexanique et dichlorométhanique renferment un faible taux d'alcaloïdes. Les hétérosides cardiotoniques ont été mis en évidence dans la fraction renfermant les insaponifiables alors que les hétérosides anthracéniques n'ont pas été mis en évidence dans les différents extraits.

3.3. Effet anti-inflammatoire

Les tests ont été réalisés sur différents extraits de la graine de Carapa : extrait total (huile commerciale), extrait hexanique, extrait méthanolique, extrait

dichlorométhanique, les acides gras et les insaponifiables. L'huile commerciale est obtenue par une extraction traditionnelle de la graine de Carapa.

4. DISCUSSION

L'effet attendu des extraits de plante, comme de l'aspirine est de combattre l'apparition de l'inflammation voire de l'empêcher. L'augmentation du volume de l'œdème de la patte postérieure gauche en fonction du temps permettra d'apprécier l'importance de l'effet anti-inflammatoire des extraits testés. Dans cette étude, cet effet sera observable par la faiblesse du pourcentage d'augmentation de l'œdème. En effet, les extraits ingérés par les rats, une heure avant de provoquer l'œdème, jouent un rôle préventif en limitant la taille de l'œdème pour les sujets traités.

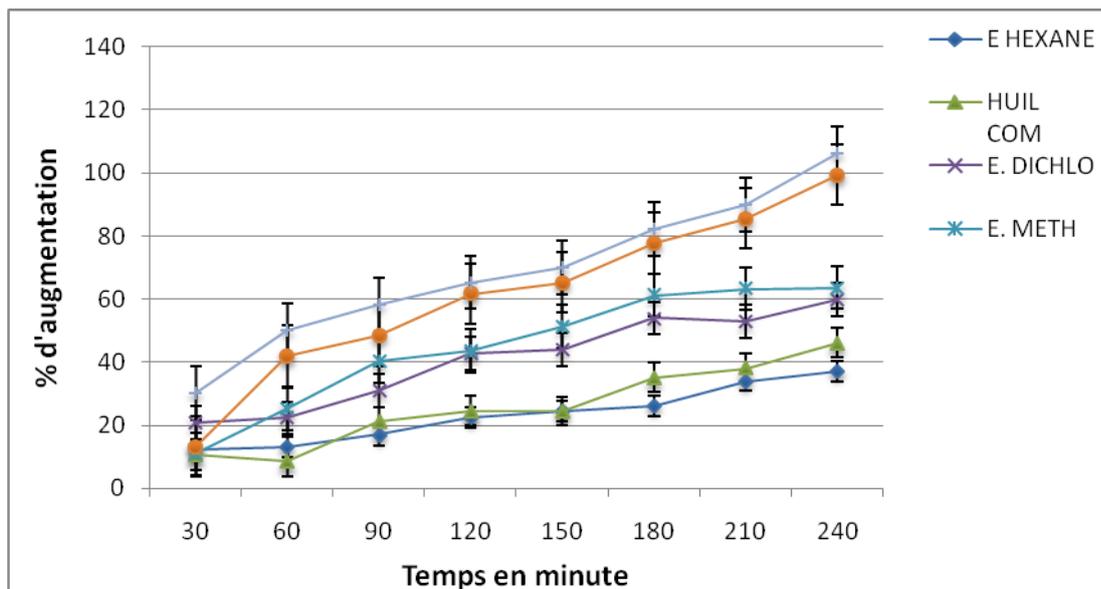


Figure 1 : Pourcentages d'augmentation de l'œdème de la patte des rats témoins et traités avec des extraits (100 mg/kg) en fonction du temps.

Les résultats présentés dans la figure 1 montrent une forte augmentation du volume de la patte de rats témoins ayant reçu uniquement l'eau physiologique ce qui témoigne l'apparition d'œdème inflammatoire suite à l'injection de la carragénine. Cependant l'évolution du volume de l'œdème mesurée pendant 4 heures est plus faible chez les rats gavés avec les extraits de la graine. Il a été montré (Fig. 2) que l'extrait hexanique et l'huile commerciale manifestent la plus forte activité anti-inflammatoire conduisant à une forte inhibition de l'œdème dès la première heure (73,79% et 82,93%). Le gavage des rats avec l'extrait dichlorométhanique et l'extrait méthanolique de la graine inhibe également l'état inflammatoire dès la première heure (49,75% et 55,60% %) mais au degré plus faible que l'extrait hexanique et l'huile commerciale. Par contre, l'administration des acides gras se révèle sans l'effet significatif sur le volume de l'œdème chez les rats traités.

Ceci permet de diviser les extraits en 3 groupes. Les acides gras comme 1^{er} groupe où aucune activité n'est observée. Le 2^{ème} groupe concerne l'extrait dichlorométhanique et l'extrait méthanolique. Et enfin, le 3^{ème} groupe qui concerne l'extrait hexanique et l'huile commerciale.

Pour le 1^{er} groupe, aussi bien pour les lots ayant reçu les acides gras que pour les témoins, on note une augmentation de 100% de l'œdème (Fig. 1). Ceci montre bien que les acides gras n'ont aucun effet anti-inflammatoire tout comme le sérum physiologique. Rien ne s'oppose à la formation de l'œdème qui se développe jusqu'à atteindre un pourcentage d'augmentation supérieur à 100% en 6 heures pour les rats de ce premier groupe. Sur la figure 2 ceci se traduit par un pourcentage d'inhibition inférieur à 10% dès 120 minutes.

Dans le groupe 2, on note un faible effet anti-inflammatoire (Fig. 1). En effet, l'augmentation de l'œdème est respectivement de 59% et 63% pour les extraits dichlorométhaniques et méthanoliques à 240 minutes. Une étude antérieure suggère que l'effet anti-inflammatoire, dans les conditions de l'expérience, n'est considéré comme intéressant que si l'évolution de l'œdème n'excède pas 50% (Messadi J.E. 1962). La figure 2 permet de constater une action intermédiaire furtive permettant une inhibition de l'œdème de 49,75% et 55,60% dès la première heure. Cet effet intermédiaire s'estompe très vite à la deuxième heure pour se stabiliser à un pourcentage d'inhibition moyen inférieur à 40%.

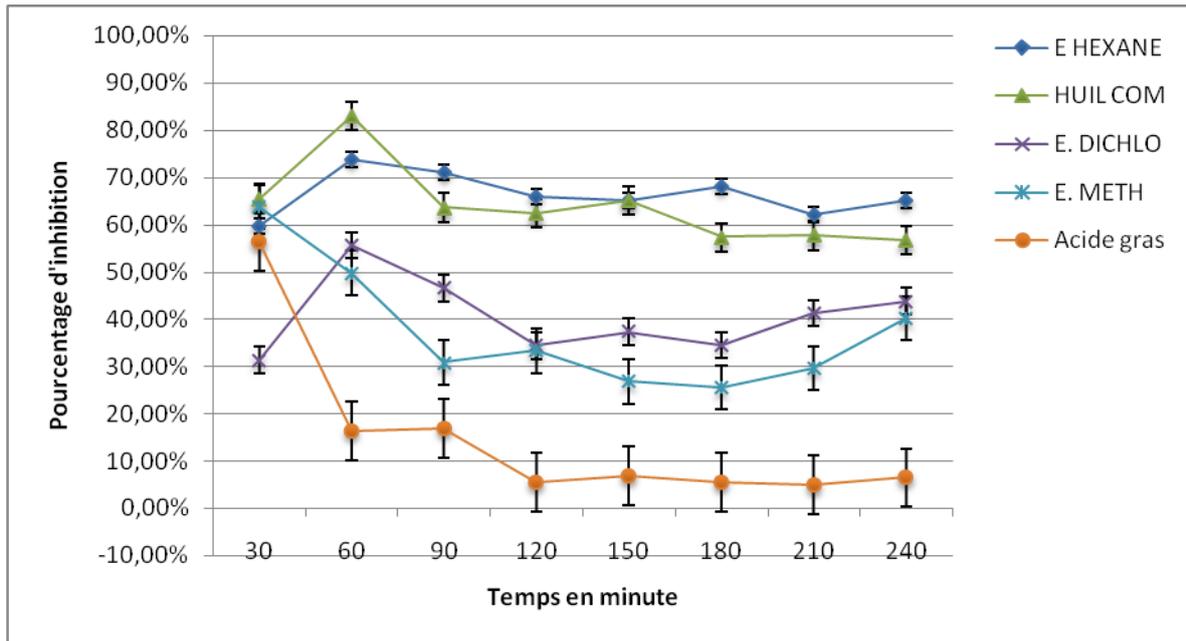


Figure 2 : Pourcentages d’inhibition de l’œdème de la patte des rats témoins et traités avec des extraits (100 mg/kg) en fonction du temps.

- De 12% d’augmentation dès les 30 premières minutes, nous passons après 4 heures à seulement 37% d’augmentation pour l’extrait hexanique à 240 minutes (Fig. 1). La même tendance est observée pour l’huile commerciale bien que moins active, on note une augmentation de 46% de l’œdème après 4 h. L’effet anti-inflammatoire n’est donc significatif que pour les extraits du 3^{ème} groupe. La figure 2 permet de voir cette inhibition très significative de ces deux extraits avec un avantage pour l’extrait hexanique qui affiche un pourcentage toujours supérieur à 60%. Pour l’huile commerciale l’effet anti-inflammatoire ne baisse qu’à partir de la 3^{ème} heure

tout en restant supérieur à 58% d’inhibition.

- Nous constatons dans cette étude que d’une part plus la polarité des solvants d’extraction est élevée, plus l’effet anti-inflammatoire de l’extrait est faible et que d’autre part l’effet des acides gras (AG) est quasi nul.

Cette absence d’activité des AG, combinée à la diminution de l’effet, lorsque nous passons d’un solvant d’extraction apolaire à un solvant d’extraction polaire, nous permet de conclure que :

Les principes actifs responsables de l’effet anti-inflammatoire sont solubles dans les solvants apolaires comme l’hexane où ils se trouvent en majorité.

Mieux encore, ces principes actifs sont parmi les composés insaponifiables.

Cette affirmation est confirmée par la recherche de l'effet anti-inflammatoire sur les insaponifiables.

Les résultats concernant l'effet des insaponifiables sont représentés dans les figure 3 et figure 4. Ces résultats montrent

un meilleur effet des insaponifiables pour une dose de 100 mg/kg. En effet, la concentration en principes actifs est plus élevée dans les insaponifiables que dans les extraits hexaniques.

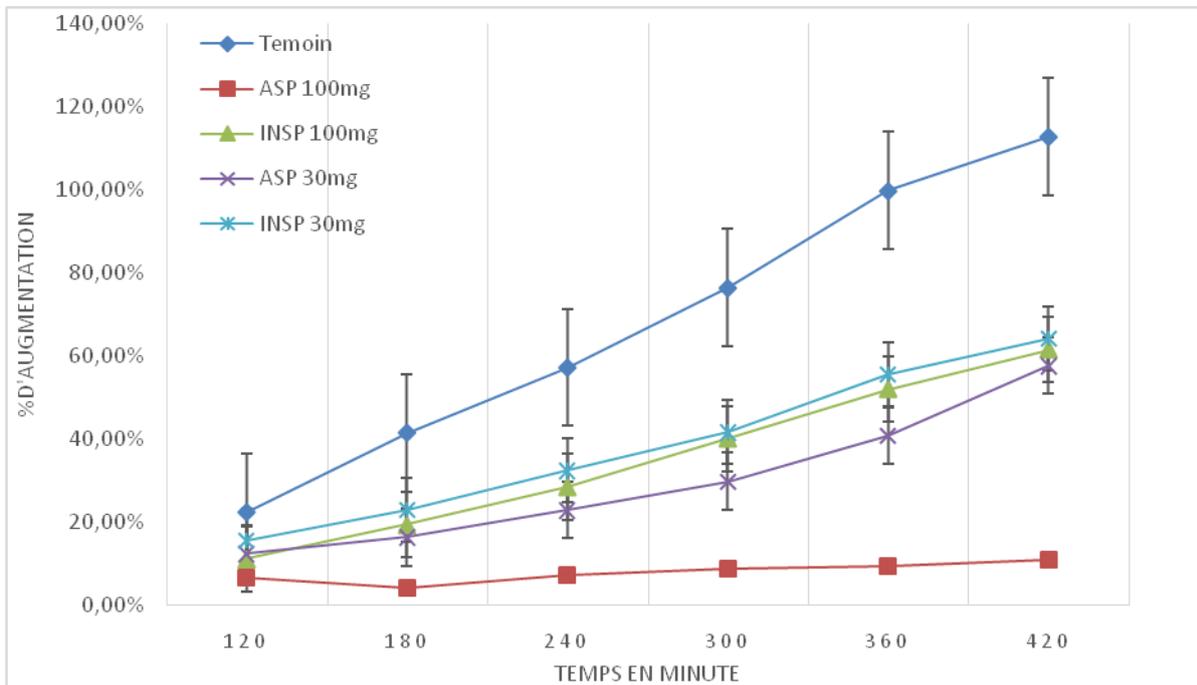


Figure 3 : Pourcentage d'augmentation du volume de la patte des rats en fonction du temps, pour des doses de 100 mg/Kg et de 30 mg/Kg

Une bonne relation dose-effet est observée, dans la mesure où une meilleure inhibition (Fig. 4) est obtenue pour une dose de 100 mg/kg comparée à une dose de 30 mg/kg. Après 5 heures d'action, cet effet bloque l'œdème à 47,54% d'inhibition.

Ces résultats sont comparables à ceux observés avec l'aspirine pour une dose de 100 mg/kg et 30 mg/kg avec des profils

similaires surtout à 30 mg/kg. On note un effet dose-dépendant beaucoup plus marqué pour l'aspirine que pour les insaponifiables de *Carapa procera*. En effet, l'aspirine montre un excellent effet même au-delà de 7 h, le pourcentage d'augmentation est maintenu à moins de 10%. Notons cependant, que nous utilisons des extraits et non des principes actifs purs.

La figure 4 résume ces observations sous forme de paliers d'inhibition. Un premier palier de 90% pour l'aspirine 100 mg/kg, un second de 60 % pour l'aspirine 30

mg/kg, de 50% pour les insaponifiables 100 mg/kg et un quatrième pour les insaponifiables 30 mg/kg.

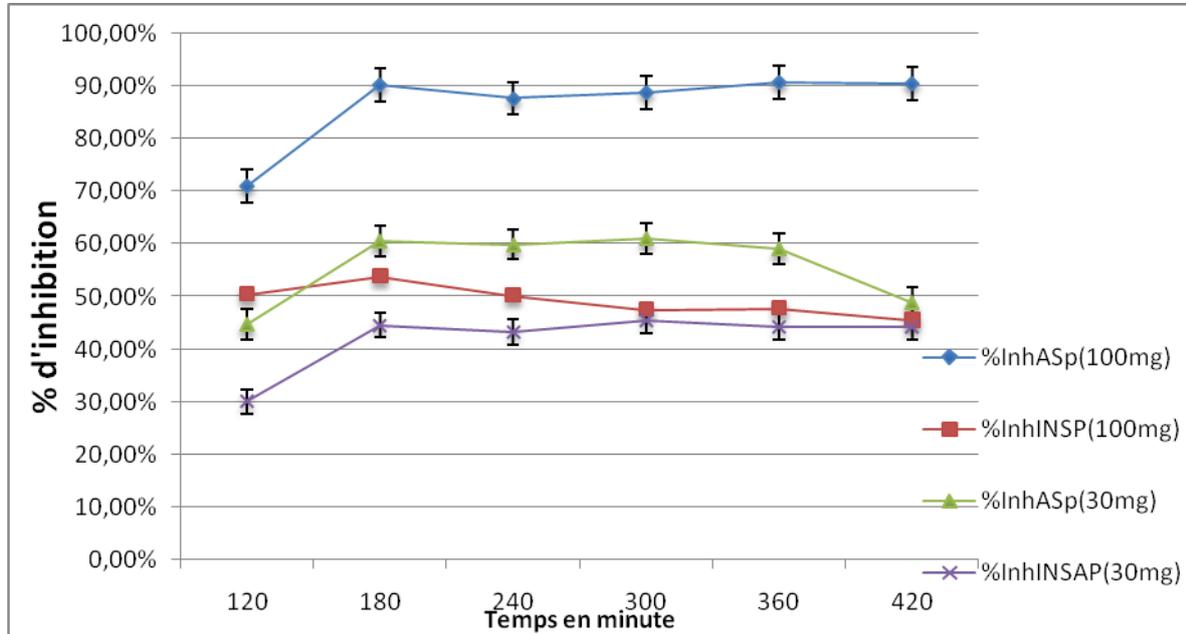


Figure 4 : Pourcentage d'inhibition du volume de la patte des rats en fonction du temps, pour des doses de 100 mg/Kg et de 30 mg/Kg

Selon Garcia et al.(2004),le test de l'œdème podal à la carragénine entraîne une réponse inflammatoire en deux phases :

- une phase initiale ou primaire entre 0 et 2,5 heures après injection de l'agent phlogogène, due à de nombreux médiateurs (histamine, sérotonine et bradykinine) ;
- une phase tardive ou secondaire, phase complément-dépendante avec surproduction de prostaglandines

pouvant aller jusqu'à 5 heures après l'injection de la carragénine.

Nos extraits actifs ont montré un effet anti-inflammatoire sur toute la durée de l'expérimentation ce qui permet de conclure à une action sur les deux phases du phénomène inflammatoire.

Les travaux d'isolement sont en cours pour identifier, par des méthodes chromatographiques et spectroscopiques, les principes actifs responsables de l'effet anti-inflammatoire de la graine de *Carapa procera*.

5. REMERCIEMENTS

Nous dédions ce travail à la mémoire du Professeur Mamadou Badiane. Nous remercions le Professeur Emmanuel Bassène, chef de service du Laboratoire de Pharmacognosie, de nous avoir permis de broyer les graines de *Carapa procera* et de réaliser le screening phytochimique dans son laboratoire.

6. REFERENCES

- AFNOR** (Association Française pour la Normalisation). *Recueil des normes françaises. Corps gras graines oléagineuses, produits dérivés*, 2^e édition, afnor, Paris, 1981, 438 p.
- Ampai P., Duangla K.** Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from *Ventilago harmadiana*. *Journal of ethnopharmacology*, 2004, 91, 237-242
- Dongmo A. B., Kamanyi A., Dzikouk G.** Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extract of *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae), *Journal of ethnopharmacology*, 2003, 84, 17-21
- Garcia-Granados A., Saenz de Buruaga J.M.** Thymelaeaceae photochemistry. II. Flavone and coumarin components of *Thymelaeae artocnaira* L. (espagnol), *Anales Quim., Ser. C: Quim. Org. Bioquim.*, 1980, 76, 96-97.
- Garcia, M.D., Fernandez, M.A., Alvarez, A., Saenz, M.T.** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. *Ozua* (Myrtaceae), *Journal of ethnopharmacology*, 2004, 91, 69-73.
- Gepdiremen A., Mshvidadze V., Elias R.** Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-c, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in Carrageenan induced rat paw edema, *Phytomedicine*, 2005, 12, 440-444.
- Hariri E.B., Sallé G., Andary C.** Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.), *Protoplasma*, 1991, 162(1), 20-26.
- Kerharo J. et Adam J. G.** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle / plantes médicinales et toxiques. Éditions Vigot frères, Paris, 1974. 539-540.
- Le Brazidec J.Y., Kocienski P.J., Connolly J.D. and Muir K.W.** Synthetic approaches to pseudopterosin G aglycone dimethylether, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1998, 1, 2475-2477.
- Lebreton P., Jay M., Voirin B.** Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chim. Anal.*, (Paris), 1967, 49, 375-383.
- Marcy R.** Les méthodes d'études pharmacologiques des stéroïdes anti-inflammatoires, *Produits pharmaceutiques*, 1991, 16(9), 402.

Messadi J.E. Etude critique des méthodes quantitatives de l'inflammation expérimentale application pharmacologique, Thèse pharmacie, Tunis, 1962.

Ndiaye M., Dieye A.M., Mariko F., Tall A., Sall D.A., Faye B. Contribution à l'étude de l'effet anti-inflammatoire de *Moringaoleifera* (moringacea), *Dakar Médical*, 2002,47(2), 210-212

Old A. S. and Kabele-Ngiefu C., Study of some Oleaginous Species of the Democratic Republic of Congo. Oilseeds, 7, 395-399 (1970).

Rizk A.M. Constituents of plants growing in Qatar, *Fitoterapia*, 1982,52, 35-42.

Vila J., BalderramaL.,Bravo J.L, Almanza G., Codina C., Bastida J. and Connolly J.D. Prenylisoflavanones from Geoffroeadecorticans, *Phytochemistry*, 1998, 49, 2525-2528.

Wei J., Wen-Yuan G. Anti-inflammatory effects of an herbal medicine on carrageenan and adjuvant induced paw edema in rat, *Journal of ethnopharmacology*, 2003, 89, 139-141.

Winder C.Y. Wax J. Burr V. Beem M. A study of pharmacological influences on UV. Erythema in guinea pigs, *Arch. int. Pharmacodyn.*, 116, 1958, 261-292.