

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCE

DEPARTEMENT DEMICROBIOLOGIE & BIOCHEMIE



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE DE LA VIE

FILISRE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique**

Par : SAFARI Wiam

MEZRAG Achewaq

Intitulé

**Etude de l'activité anti-inflammatoire et
antibactérienne des extraits de *Bougainvillea glabra***

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. BOUBAKER HAFSA

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Président

Dr. BENSSLAMA ABDRAHIM

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Rapporteur

Dr. BOUAZIZ SAMIA

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Examineur

Année universitaire : **2023 /2024**

Dedícace

À la mémoire de mes grands-parents et arrière-grands-parents. Je dédie ces notes à ma mère et mon père, Une source de tendresse et un exemple de sincérité qui n'a jamais cessé encourager-moi et priez pour moi.

Aucune dévotion ne peut être assez éloquente pour exprimer ce que vous êtes Je mérite tout l'amour et les sacrifices que tu ne cesses de me donner Depuis ma naissance, jusqu'à mon enfance et même à l'âge adulte.

Que Dieu le protège et le garde pour moi.

*Je remercie également et dédie ce travail à tous mes chers frères, **Ramzi, Haïtham, Hoda et Hana.***

*Pour Ce travail, je voudrais particulièrement mentionner **Dr. Kherbache et Dr. Djellal.***

Dédicace

Je dédie le fruit de ma réussite à ma mère et à mon père, la source de ma force et la raison de mon succès.

Je remercie également mes frères, mes sœurs, mon mari, mes amis et mes professeurs.

Achwaq

Remerciement

Tous d'abord nous tenons à remercier allah tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nous remercions notre encadrant de mémoire Dr. Ben Slama et membres du jury Dr. BOUAZIZ SAMIA et Dr. BOUBAKER HAFSA. Nous adressons aussi nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation au long de ces années

Pour Ce travail, je voudrais particulièrement mentionner Dr. Kherbache et Dr. Djellal

Wiam - Achwaq

Sommaire

INTRODUCTION	1
Chapitre I Généralités sur l'inflammation	2
I.1 Définition de l'inflammation	2
I.1.1. Causes de l'inflammation	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
I.2 Types d'inflammations	2
I.2.1. <i>Inflammation aiguë</i>	2
I. 2.2. <i>Inflammation chronique</i>	4
I.3. Les acteurs de la reaction inflammatoire	4
I. 3. 1. <i>Les cellules de l'inflammation</i>	4
I.3. 2. Les médiateurs chimiques de l'inflammation	6
I.4. Les facteurs d'origine locale	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
I.4.1. <i>Les derives de l'acide arachidonique</i>	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
I.4.2. La voie de la cyclooxygenase	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
I.4.3. La voie de la lipoxigenase	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
I.5. Les Anti-inflammatoire pharmaceutiques	7
I.5.1. Anti-inflammatoires steroïdiennes (AIS) ou glucocorticoïdes	7
I.5.2. Anti-inflammatoires non steroïdiens (AINS)	8
I.6. Les Anti-inflammatoires naturels	9
II.1. Définition	18
II.2. Caractérisation botanique	18
II.3. Classification	19
II.4. Utilisations thérapeutiques de la plante bougainvillée	19
III.1. Généraliti	22
III.2. Bacterie staphylococcuse	23
III.3. Bacterie Bacillus	23
III.4. Bacterie Pseudomonas	23

III.5. Les antibiotiques	24
IV.1. Materials	26
<i>IV.1.1 Matériel divers</i>	26
IV.1.2. Produits chimiques	26
IV.1.3. Matériel végétal	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
IV.2. Préparation des extraits	26
IV.2.1. Dosage des métabolites des extraits	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
IV.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro	28
IV.3.1 Test de la dénaturation thermique des protéines	28
IV.4. Evaluation d'Activity anti-bacterie	28
IV.4.1. Matériels ET méthodes	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
Chapitre V. Résultats et discussion	32
V.1. Rendements d'extraction	32
V.2. Dosage de polyphénol et flavonoïde	33
V.2.1. Teneur en polyphénols totaux	33
V.2.2. Teneur en flavonoïdes	34
V.3. L'activité anti-inflammatoire et antibactérien	35
V.3.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro	35
V.3.2. Évaluation de l'activité antibactérienne	36
Conclusion	40
Références bibliographiques	40

الشجرة الجهنمية (*Bougainvillea glabra*) من النباتات المستخدمة في الطب التقليدي لعلاج الأمراض الالتهابية. كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للالتهابات والبكتيريا في المختبر للمستخلصات المائية والميثانولية لهذا النبات.

كشفت الفحص الكيميائي النباتي، عن وجود مركبات كيميائية مثل الفلافونويد، والفينول والتي قد تكون مسؤولة عن الخصائص المضادة للالتهابات.

تم تقييم النشاط المضاد للالتهابات والمضاد للبكتيريا في المختبر بواسطة المستخلصات المائية والميثانولية للنبات المذكورة أعلاه. أظهرت نتائج دراسة النشاط المضاد للالتهابات والنشاط المضاد للبكتيريا في المختبر بلغ إنتاج المستخلص المائي %12,86 مغ/غ والمستخلص الميثانولي %23,076 مغ/غ تم تحديد محتوى البوليفينول لمستخلص المائي ب66,660 مغ/غ والمستخلص الميثانولي ب68,488 مغ/غ و محتوى الفلافونويد لمستخلص مائي 70,09 مغ/غ و المستخلص الميثانولي 62,46 مغ/غ.

فيما يتعلق بدراسة النشاط المضاد للالتهابات، أجرينا اختبار تمسخ بروتين BSA في المختبر وأظهرت النتائج أن المستخلصات المائية والميثانولية لها نشاط مضاد للالتهابات. كما تم إجراء اختبار مضاد للبكتيريا للمستخلصات المائية والميثانولية على ثلاث سلالات بكتيرية. أظهرت النتائج أنه لم يكن للمستخلصين أي نشاط مضاد للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للالتهاب، البوغانفيليا

Abstract

Bougainvillea (*Bougainvillea glabra*) is a plant used in traditional medicine to treat inflammatory diseases. The aim of this study was to evaluate the in vitro anti-inflammatory and antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of this plant.

Phytochemical screening revealed the presence of chemical compounds such as flavonoids and phenolic compounds that could be responsible for the anti-inflammatory.

In vitro anti-inflammatory and antibacterial activity was evaluated using aqueous and methanolic extracts of the above-mentioned plant. The results of the anti-inflammatory and antibacterial activity study showed that the yield of the aqueous extract was 12.86% mg/g and that of the methanolic extract was 23.076% mg/g. The polyphenol content of the aqueous extract was 66.660 mg/g and that of the methanolic extract was 68.488 mg/g, and the flavonoid content of the aqueous extract was 70.09 mg/g and that of the methanolic extract was 62.46 mg/g.

Regarding the study of anti-inflammatory activity, we performed an in vitro BSA protein denaturation test and the results showed that the aqueous and methanolic extracts have anti-inflammatory activity. An antibacterial test of the aqueous and methanolic extracts was performed on three bacterial strains. The results showed that the two extracts.

Keywords: Polyphenols, flavonoids, antibacterial activity, anti-inflammatory activity:
Bougainvillea

Resumé

Bougainvillea glabra est une plante utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les maladies inflammatoires. Le but de cette étude était d'évaluer l'activité anti-inflammatoire et antibactérienne in vitro des extraits aqueux et méthanoliques de cette plante.

Le criblage phytochimique a révélé la présence de composés chimiques tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques qui pourraient être responsables des propriétés anti-inflammatoires.

L'activité anti-inflammatoire et antibactérienne a été évaluée à l'aide d'extraits aqueux et méthanoliques de la plante susmentionnée. Les résultats de l'étude de l'activité anti-inflammatoire et antibactérienne in vitro ont montré que le rendement de l'extrait aqueux était de 12,86 % mg/g et celui de l'extrait méthanolique de 23,076 % mg/g. La teneur en polyphénols de l'extrait aqueux a été déterminée à 66,660 mg/g et celle de l'extrait méthanolique à 68,488 mg/g, et la teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux à 70,09 mg/g et celle de l'extrait méthanolique à 62,46 mg/g.

En ce qui concerne l'étude de l'activité anti-inflammatoire, nous avons effectué un test in vitro de dénaturation de la protéine BSA et les résultats ont montré que les extraits aqueux et méthanoliques ont une activité anti-inflammatoire. Un test antibactérien des extraits aqueux et méthanoliques a été effectué sur trois souches bactériennes. Les résultats ont montré que les deux extraits n'avaient aucune activité antibactérienne.

Mots-clés : Polyphénols, flavonoïdes, activité antibactérienne, activité anti-inflammatoire, Bougainvilliers

Liste des abreviations

ACTH : Adréno cortico trophine hormone

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

Aq : l'extrait aqueux

BSA : Albumine de sérum bovin

CD4 : cluster de differenciation 4

CD8 : cluster de differenciation 8

COX1 : La cyclooxygénase-1.

COX2 : La cyclooxygénase-2.

Facteur XII (Hageman) : est une enzyme sérique qui est activée par les complexes Ag-Ac, les fragments du collagène issus de protéolyse, les corps insolubles.

IL-1 : Interleukine 1

IL-6: Interleukine 6

INF- α : Tumor necrosis factor α

Met : l'extrait méthanolique

L'OMS : L'Organisation mondiale de la Santé

LPS : Le lipopolysaccharide

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

NK : cellule Natural Killer

PAF : Facteur d'activation des plaquettes

PG: Prostaglandine

PMN(s): Polynucléaire neutrophile

SC : Le système du complément

μ g EAG/mg E : : Microgramme équivalent d'acid gallique par milligramme d'extrait

μ EQ/mg E : Microgramme équivalent de Quercitine par milligramme d'extrait

Liste des figures

Figure 1. Bougainvillea glabra	18
Figure 2. Structure et organisation d'une cellule bactérienne.....	22
Figure 3. Bougainvillea	26
Figure 4. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	33
Figure 5. Courbe d'étalonnage de la Quercitine	34
Figure 6. . L'effet de l'extrait aq et Me sur l'inhibition de la dénaturation des protéines.. خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.	
Figure 7. . L'effet de l'extrait aq et Me sur l'inhibition de la dénaturation des protéines	18

Liste de tableaux

Tableau 1. Les points de différenciation entre les inflammations aiguës et chroniques incluent ..	4
Tableau 2. Les cellules de l'inflammation ..	5
Tableau 3. Analyses quantitatives de l'extrait de Bougainvillea ..	34

Introduction

INTRODUCTION

Des maladies ont été traitées à l'aide de médicaments à base de plantes à travers le monde pendant des millénaires (Houmènou *et al.*, 2018). Dans le monde entier, les plantes médicinales jouent un rôle essentiel dans les soins de santé et leur demande est de plus en plus importante (Ladoh-Yemeda *et al.*, 2016). Selon une étude de l'OMS, environ 80% des personnes vivant dans les pays en développement utilisent les plantes médicinales pour leurs besoins de santé primaires (Tangara *et al.*, 2022).

On a largement reconnu les vertus médicinales des plantes naturelles, ce qui en fait une source essentielle de nouveaux produits pharmaceutiques et de soins de santé. (Süntar ,2020).

L'inflammation représente une réponse immunitaire de l'organisme face à différentes agressions, qu'elles soient physiques, chimiques, biologiques ou infectieuses (Ndiaye *et al.*, 2006). La réponse inflammatoire est généralement salutaire, elle vise à éliminer l'agent pathogène et à réparer les dommages aux tissus. L'inflammation peut parfois être préjudiciable en raison de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, de dysfonctionnements des régulations du processus inflammatoire ou de dysfonctionnements quantitatifs ou qualitatifs des cellules impliquées dans l'inflammation (Weill *et al.*, 2003; Medzhitov, 2010).

De nos jours, avec l'émergence de la résistance microbienne aux antibiotiques, les chercheurs ont commencé à explorer le monde végétal, notamment les plantes médicinales et culinaires, pour trouver des molécules naturelles efficaces et sans effets secondaires. (Boudjouref, 2011).

Les antibiotiques servent à soigner les infections causées par des bactéries. Ils ne résistent pas aux infections virales, Ils peuvent contenir des bactéries ou les lutter contre eux (Werth, 2020).

Les antibiotiques peuvent entraîner des résistances bactériennes multiples en raison de leur utilisation inadéquate et abusive en santé humaine et vétérinaire, ce qui représente un problème de santé publique (Mozina *et al.*, 2011).

L'objectif de la présente étude est de mettre en évidence l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire des extraits aqueux et méthanoliques de bougainvilliers dans le but de développer de nouveaux antibiotiques et agents anti-inflammatoires naturels n'ayant pas d'effets nocifs sur la santé humaine par rapport à leurs homologues synthétiques .

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur

L'inflammation

Chapitre I. Généralités sur l'inflammation

I.1 Définition de l'inflammation

L'inflammation représente une réponse protectrice dynamique complexe face à une lésion cellulaire, à une infection par des microbes, à un traumatisme ou à des toxines présentes dans les tissus vascularisés. On dilue, détruit ou isole l'agent causal, ce qui entraîne une cascade d'événements moléculaires qui aboutissent à la réparation, à la guérison et à la reconstitution du tissu endommagé (Ansar et Ghosh, 2016).

I.2 Types d'inflammations

I.2.1. Inflammation aiguë

L'inflammation correspond à une réaction rapide et précoce à un agent nocif et a une durée relativement courte, pouvant être de quelques minutes, de plusieurs heures ou de quelques jours. Elle se distingue par la production de protéines en fluide et en plasma, ainsi que la migration de leucocytes neutrophiles vers le lieu de l'infection (Jain *et al.*, 2015).

- ✓ Rougeur (friction) causée par la dilatation des petits vaisseaux sanguins dans les tissus endommagés, comme cela se produit dans la cellulite.
- ✓ Chaleur (calories) causée par une augmentation du flux sanguin (congestion) due à la dilatation des vaisseaux sanguins dans la zone.
- ✓ Gonflement (tumeur) provoqué par l'accumulation de liquide dans l'espace extravasculaire, qui à son tour est dû à une perméabilité vasculaire accrue.
- ✓ Douleur (douleur), provoquée en partie par l'étirement et la destruction des tissus par un œdème inflammatoire et en partie par le pus sous pression dans la cavité de l'abcès. Certaines substances chimiques inflammatoires aiguës, notamment la bradykinine, les prostaglandines et la sérotonine, sont également connues pour provoquer des douleurs.
- ✓ Perte de fonction : la zone enflammée est supprimée par la douleur tandis qu'un gonflement sévère peut également immobiliser physiquement les tissus.

L'inflammation aiguë est classée en réponses vasculaires précoces et réponses cellulaires tardives (Jain *et al.*, 2015).

I.2.1.2. Les phase d'inflammation aiguë

I.2.1.2.1. Phase vasculaire

Phase vasculaire Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelque seconde. Elle est due À l'action de système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine, l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux. Cette constriction n'est pas innocente sur les plaquettes présentes dans la circulation, laquelle est perturbée. Ces plaquettes vont alors s'activer. Très vite à cette vasoconstriction, va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des cellules sanguines (diapédèse). Ce qui explique en partie la constitution de la chaleur et de la rougeur. La migration des cellules s'accompagne d'un transfert de plasma qui crée l'œdème (Kumar *et al.*, 2007).

I.2.1.2.2. Phase cellulaire

La phase cellulaire commence par un flux de polynucléaires neutrophiles qui se fixent aux parois vasculaires (margination) en alignement avec la zone inflammatoire, puis traversent ces parois (diapédèse) et migrent vers le foyer inflammatoire (chimiotactisme). Après avoir été en contact avec l'inflammation, ces globules Blancs, après avoir adhéré à la membrane et s'englobé, vont attaquer les micro-organismes ou autres organismes. Ce n'est que par l'existence d'enzymes présentes dans les granules des leucocytes que cette digestion possible. La libération des médiateurs chimiques de l'inflammation produits lors de la première phase par les cellules et éventuellement par le système de complément est responsable de l'arrivée des polynucléaires. (Kumar *et al.* , 2007).

I.2.1.2.3. Phase réparation

La phase de résolution, La phase de résolution, également appelée réparation, du niveau de dommages aux tissus. Effectivement, sous les conditions les plus propices, les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) éliminent les agents agresseurs, tandis que les produits de dégradation et les débris cellulaires sont ingérés par les macrophages. La production de cytokines et de médiateurs par les macrophages va alors entraîner la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Les cellules endothéliales sont responsables de la réparation de l'endothélium. (Taïba *et al.*, 2017).

I. 2.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique correspond à un échec de l'inflammation aiguë et induit de nombreuses pathologies (Noack et Kolopp-Sarda, 2018). L'inflammation chronique est liée à une réponse immunitaire tissulaire, ce qui peut entraîner l'activation de moyens de défense particuliers ou non (Jackson et Evers., 2006).

I.2.2.1. Points de différenciation entre inflammations aiguës et chroniques

Tableau 1. Les points de différenciation entre les inflammations aiguës et chroniques incluent (Liu et Rabinovich, 2010).

Caractéristiques	Inflammation aiguë	Inflammation chronique
Durée	Court	Relativement long
Modèle	Stéréotypé	Varié
Cellule prédominante	Neutrophiles	Plasma, cellules, macrophages, Lymphocytes
Destruction des tissus	Légère à modérée	Marqué
Fibrose	Absent	Présent
Réaction inflammatoire	Exsudatif	Productif

I.3. Les acteurs de la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est l'aboutissement d'un processus complexe impliquant des cellules et des médiateurs cellulaires, à travers différentes voies d'activation.

I. 3. 1. Les cellules de l'inflammation

Les cellules qui participent à l'inflammation sont dites immunocompétentes ; ils proviennent d'un précurseur commun, la cellule souche hématopoïétique pluripotente de la moelle osseuse (Tableau 2) (Charles *et al.*, 2010).

Tableau 2. Les cellules de l'inflammation (Charles *et al.*, 2010).

Type	Fonction
Cellules Phagocytaires	Les cellules neutrophiles polynucléaires et les monocytes/macrophages sont les premières cellules à se déplacer vers le foyer lésé et sont capables de neutraliser les agressions par phagocytose.
Lymphocytes	. Il s'agit de cellules spécifiques de l'immunité, à la fois humorales et cellulaires, de type B, T ou NK. Parmi les lymphocytes T, certains sont appelés auxiliaires (helper) (CD4), tandis que d'autres sont cytotoxiques (CD8) et produisent des cytokines. Les plasmocytes (la maturation de la lignée B) produisent des anticorps, tandis que les lymphocytes NK peuvent être cytotoxiques.
Polynucléaires Basophiles	Les acteurs principaux de la réaction allergique et de différents processus immunologiques et inflammatoires sont les composés vasoactifs (l'histamine).
Polynucléaires Eosinophiles	Ils jouent un rôle essentiel dans l'inflammation allergique. Effectivement, ils contiennent de l'histaminase dans leurs granules, une enzyme qui agit sur l'histamine et la neutralise.
Mastocytes	Les granulations des mastocytes renferment des médiateurs chimiques de l'inflammation tels que l'histamine, l'héparine et la sérotonine. En présence d'une bactérie ou d'un parasite, elles peuvent envoyer des signaux au système immunitaire et provoquer une réponse immédiate.
Plaquettes	Aussi connues sous le nom de thrombocytes, elles sont de petites cellules sans noyau. Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans la coagulation, car elles empêchent le saignement lorsqu'une brèche se forme au niveau du tissu affecté.

Fibroblastes	Les cellules sont responsables de la production de collagène et jouent un rôle crucial dans la cicatrisation.
---------------------	---

I.3. 2. Les médiateurs chimiques de l'inflammation

Le déclenchement et la poursuite de l' inflammation, sa diffusion a partir du foyer inflammatoire font appel à des facteurs synthétisés localement ou qui sont présents à l' état de précurseur inactif dans la circulation sanguine.

I.3.2.1. Les médiateurs plasmatiques circulants

Les médiateurs circulants ne sont actifs qu'après une succession de réactions qui régulent leur production.

I.3.2.1.1. Le système de coagulation

Les éléments solides (cristaux), les composés biologiques (LPS bactérien) et les complexes immuns activent le facteur XII (Hageman), Ce qui provoque la coagulation et la formation de fibrine à partir du fibrinogène. Le clou hémostatique formé par l'agrégation des plaquettes est renforcé par la fibrine ainsi créée. IL est également un agent chimiotactique efficace pour les polynucléaires neutrophiles, la fibrine joue également un rôle dans la perméabilité vasculaire en influençant le système des kinines (Weill B *et al.* ,2003).

I.3.2.1.2. Le système des kinines

Le système du Les kininogènes Précurseurs inactifs des kinines, donnent naissance, sous l'effet des kallibréines. Àdenombreux petits peptides vaso-actifs qui augmentent la chaleur locale et la douleur. Ceux-ci sont rapidement détruits sous l'effet des kinases La bradykinine. Produit emblématique de cette famille, est un nonapeptide qui augmente puissamment la perméabilité vasculaire. La bradykinine est responsable de la douleur par interaction avec des récepteurs spécifiques sur les neurones sensoriels, et elle agit avec la plasmine en activant h voie alterne du complément, ce qui amplifie la réaction inflammatoire (Weill B *et al.* ,2003).

I.3.2.1.3 Le système du complément

Le système du complément (SC) a été découvert à la fin des années 1890. Il est alors décrit comme un composant thermolabile du sérum, qui possède des propriétés antimicrobiennes, capable de compléter l'action des anticorps. Depuis, les connaissances ont évolué et il est désormais établi que ce système fait partie intégrante du système immunitaire inné. Le SC fait référence à un ensemble de protéines sériques qui jouent un rôle primordial dans l'immunité innée : elles permettent à l'hôte de se défendre contre les pathogènes ; elles participent à l'élimination de ses propres cellules en condition d'apoptose. À la surface des cellules apoptotiques ou du pathogène, le système du complément peut être activé en cascade selon trois voies : la voie classique, la voie des lectines ou la voie alterne. Ces trois voies convergent pour aboutir à l'activation de la protéine C3 (C pour complément) avec pour résultat la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM). Le CAM est à l'origine de la lyse des pathogènes ou de l'activation de certaines cellules de l'hôte. En dehors de leur action directe, chacune de ces voies peut induire des réponses inflammatoires et moduler les réponses immunitaires innée et adaptative conduisant ainsi à l'élimination des pathogènes, des complexes immuns et des cellules apoptotiques. (Merle et al.2015).

I.4. Les Anti-inflammatoire pharmaceutiques

Les anti-inflammatoires font partie de différentes classes chimiques et ont une action purement symptomatique sur la réaction aspécifique des tissus à un agent agresseur, ce qui empêche la transition de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique (Muster, 2005).

I.4.1. Anti-inflammatoires stéroïdiennes (AIS) ou glucocorticoïdes

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes sont des molécules synthétiques dérivées des hormones naturelles (cortisone et cortisol) ou hémisynthétisés à partir d'extraits animaux ou végétaux (Kada, 2018). Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies autoimmunes. (Mansour, 2015). Les médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien, sont appelés anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS). Les glucocorticoïdes sont des hormones dérivées du cholestérol, dont la sécrétion est stimulée par l'ACTH libérée par le lobe antérieur de l'hypophyse dans un cycle nyctéméral. Les glucocorticoïdes se fixent aux récepteurs des glucocorticoïdes du cytoplasme de la cellule dans les tissus cibles. Le complexe récepteur-ligand ainsi formé entre ensuite dans le noyau

cellulaire où IL se lie à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes correspondants.

Les glucocorticoïdes classiques ne distinguent pas la transactivation de la transrépression et interagissent avec les gènes immunes « volontaires » et ceux « non volontaires » qui régulent les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. En Ce moment, les chercheurs cherchent à trouver des glucocorticoïdes sélectifs qui pourraient ne réprimer que le système immunitaire (Henzen, 2003).

I.4.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont un groupe de substances qui ont des effets anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Leur efficacité ainsi que leurs effets secondaires principaux sont liés à leur mécanisme d'action principal, qui consiste à inhiber les cyclo-oxygénases, enzymes qui sont responsables de la production de prostaglandines et de thromboxane. Contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens sélectifs de la COX-2, les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques inhibent les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2). Les effets secondaires sont supposés être moins importants (Bacchi *et al.* 2012).

I.4.2.1. Troubles digestifs

Grâce à leur action sur les COX, les AINS inhibent la production de PG qui a une action protectrice sur la muqueuse du système digestif. La présence de troubles fonctionnels tels que les douleurs abdominales, la dyspepsie, les nausées et les diarrhées est donc courante et réversible après l'arrêt du traitement (Cofer. 2010). ILS encouragent aussi l'apparition d'ulcères gastroduodénaux, qui sont 3 à 5 fois plus fréquents, et qui peuvent se révéler sévères tels que des perforations ou des hémorragies digestives parfois mortelles (Thiéfin. 2003, Nagata *et al.* 2016).

Une étude italienne a montré récemment que les enfants sont également exposés aux saignements digestifs dus aux AINS, y compris lors d'une utilisation de quelques jours (Cardile *et al.* 2016). Ces effets peuvent affecter l'ensemble du tube digestif, essentiellement l'estomac et duodénum, mais aussi l'œsophage, l'intestin grêle et le colon. De plus, ils augmentent les poussées de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) (Russell, 2001).

I.4.2.2. Réactions cutanéomuqueuses et allergiques

Elles se manifestent par des sensations de prurit, d'urticaire, des éruptions variées, mais aussi par des symptômes de rhinite, de bronchospasme, voire d'œdème de Quincke ou de choc

anaphylactique. Un autre risque, connu sous le nom de syndrome de Widal, a été décrit comme étant lié à une allergie à l'aspirine (Cofer, 2010).

I.5.2.3. Troubles renaux

La perfusion rénale et le débit de filtration glomérulaire sont influencés par les COX 1, tandis que les COX 2 jouent un rôle dans l'élimination du sodium et de l'eau (Hörl., 2010). IL EST donc possible que leur blocage par les AINS ait des répercussions sur la fonction rénale. Il s'agit d'une accumulation d'hydrosode, qui peut causer des douleurs aux membres inférieurs, une augmentation de la pression artérielle ou une défaillance cardiaque (Hörl. 2010, Cofer, 2010).

Selon les cas de rénal annuel associé aux AINS sont estimés à 2,5 millions aux États-Unis (Hörl, 2010).

I.5. Les Anti-inflammatoires naturels

Le règne végétal contient un grand nombre de composés phytochimiques ayant un large spectre d'activité. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires, par exemple : Saule blanc : Europe, Asie et, dans une certaine mesure, Amérique du Nord (Wichtl M., Anton R., 2003). Le curcuma est originaire d'Asie du Sud (Bruneton J., 2009). Pin sylvestre (aiguilles) Europe et Asie du Nord (Matthias, J. Akzel, 1. Samuel, J. G. A. 2003).

Chapter II:

BOUGAINVILLE

II.1. Définition

Le nom du genre *Bougainvillea* vient du naturaliste et explorateur français Philibert Commerson. Naturaliste et explorateur français Philibert Commerson, qui l'a découvert pour la première fois à Rio de Janeiro, au Brésil, en 1768. Découvert pour la première fois à Rio de Janeiro, au Brésil, en 1768. En l'honneur de son compatriote Louis Antoine de bougainvillea, explorateur et navigateur français (Cumo, 2013). *Bougainvillea* est une plante d'importance ornementale, endémique de l'Amérique du Sud. Introduite de manière pantropicque et distribuée dans les régions chaudes du Mexique, de l'Asie, de l'Australie Régions chaudes du Mexique, de l'Asie, de l'Australie, des Caraïbes, de l'Afrique du Sud, des États-Unis et d'autres pays (Lim, 2014).



Figur 1. *Bougainvillea glabra* (Seema *et al.* 2018)

II.2. Caractérisation botanique

Le botaniste suisse Jacques Denys Choisy a identifié *B. glabra* en 1850 (Napoleón *et al.* 2013). Il s'agit d'un arbuste grimpant vivace mesurant 1 à 7 m de haut , avec des branches aux épines incurvées de 5 à 15 mm de long ; feuilles simples, vert foncé, un peu brillantes sur la face supérieure, pétiole de 1 cm de long, adaxialement glabre et abaxial pubescent, d'environ 10 cm de long ; fleurs de 0,4 cm de diamètre, bisexuées, en inflorescence cymeuse à trois fleurs blanches à crème, périanthe de 1–2,5 cm de long, légèrement pubescent, avec un seul carpelle, un ovaire et six à huit étamines ; bractées chartacées, ovales de 5 cm de long et 1,54 cm de large, à base cardioïde et à extrémités pointues, adhérentes aux fleurs dans la région terminale de la

nervure médiane, de couleurs variées ; avec de petits fruits akènes secs, à une seule graine et côtelés. *B. glabra* habite des climats chauds, semi-chauds, secs, semi-secs et tempérés (Lim, 2014).

II.3. Classification: (Gobato ,2016)

Royaume : Plantes.

Sous-règne : Trachéobionte.

Superdivision : spermatophytes.

Division : Magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Sous-classe : Caryophyllidés.

Ordre : Caryophyllales.

Famille : Nyctaginacées.

Genre : bougainvillea

II.4. Utilisations thérapeutiques de la plante bougainvillea

B. glabra est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter principalement les maladies respiratoires et diverses affections, Au Mexique, *B. glabra* est communément connu sous une grande variété de noms tels que bougainvillea pourpre, fleur de papier, Santa Rita, mais il est également nommé dans des langues autochtones telles que shpupukuishonat (mixtèque), katsjoxhuan (Popolac) et jukua (Nahuatl). (Lim, 2014 ; Schlaepfer et García, 2017). Les bractées de bougainvillea sont souvent confondues avec des pétales de fleurs et constituent la partie la plus utilisée dans la médecine traditionnelle mexicaine pour traiter les affections respiratoires telles que la toux, l'asthme, la grippe et la bronchite à travers une variété de recettes ; son utilisation a également été rapportée pour traiter des problèmes gastro-intestinaux tels que la diarrhée , Au Nigéria, il est utilisé pour traiter l'inflammation et comme analgésique (Ogunwande *et al.* 2019). En Thaïlande, les fleurs sont incluses dans l'alimentation quotidienne pour soigner les maux d'estomac et les nausées (Kaisoon *et al.* , 2012). À Mandsaur, en Inde, les bougainvillea aident à réduire les brûlures d'estomac, à traiter les maux de gorge, la leucorrhée, les vaisseaux sanguins et l'hépatite (Edwin *et al.* ,2007 ; Gupta *et al.* ,2009). . Les extraits de *B. glabra* sont utilisés en Afrique pour améliorer les troubles intestinaux (He *et al.*, 2020). . Les constituants mentionnés dans la plante sont les bétacyanines, les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes. Les feuilles auraient un potentiel anti-inflammatoire. Les praticiens traditionnels

locaux de Mandsaur (Inde) utilisent les feuilles de Bougainvillea comme médicament pour divers troubles gastro-intestinaux tels que l'acidité. En outre, il a été observé que l'activité anti-diarrhéique de *B. glabra* est associée à une propriété antimicrobienne. Précédemment, Vargas et Petricevic (2018) ont publié une revue sur la structure chimique, la pharmacologie et la toxicologie du genre Bougainvillea. De même, une mini-revue a déjà été publiée détaillant le potentiel antioxydant de cette plante (Hammad Saleem *et al*, 2021) . La Bougainvillea glabra a été authentifiée après avoir été testée à l'aide de différents modèles pharmacologiques basés sur des maladies, en utilisant divers extraits de racines, de feuilles et de l'huile de racine comme échantillons de test. Notre article de revue se concentre sur les activités pharmacologiques suivantes : antioxydant, anthelminthique, antidiabétique, anti-levure, et antibactérien. (V. Kalaiyaran1 *et al*, 2015)

CHAPTER III :

Les

bactéries

III.1. Généralités

Les micro-organismes sont omniprésents dans la nature. Ils constituent la base de la chaîne alimentaire, jouent un rôle de premier plan dans le cycle du carbone et de l'azote et influencent la vie quotidienne de diverses manières, à la fois néfastes et bénéfiques. En effet, le développement et l'amélioration continus de nouveaux outils moléculaires et de techniques de séquençage de l'ADN ont considérablement amélioré notre compréhension de la relation entre nous et notre microbiome. Des études récentes suggèrent que les interactions avec les microbes contribuent à un développement sain et que la perturbation du microbiome central peut entraîner des problèmes de santé graves. En revanche, l'importance des interactions entre les microbes et les plantes a été reconnue bien avant cela. La découverte que le sol entourant les racines des plantes, appelé rhizosphère, est beaucoup plus riche en bactéries que le sol environnant, a déclenché la recherche sur les microbes végétaux (Christopher et al. ,2020).

III.2. Définition de bactérie

Les cellules procaryotes sont des bactéries. Les organites qu'elles possèdent dans le cytoplasme sont les ribosomes, plus petits que ceux des cellules eucaryotes, sauf les mycoplasmes. Une paroi complexe entoure les bactéries, qui varie en fonction de leur Gram positif ou négatif. Il s'agit d'organismes vivants, tout comme les virus et les champignons. Elles ont été découvertes à la fin du XVIIe siècle par le naturaliste hollandais Anthoni van Leeuwenhoek, qui a développé la microscopie (Flandrois, 2000).

III.3. Structure d'une cellule bactérienne

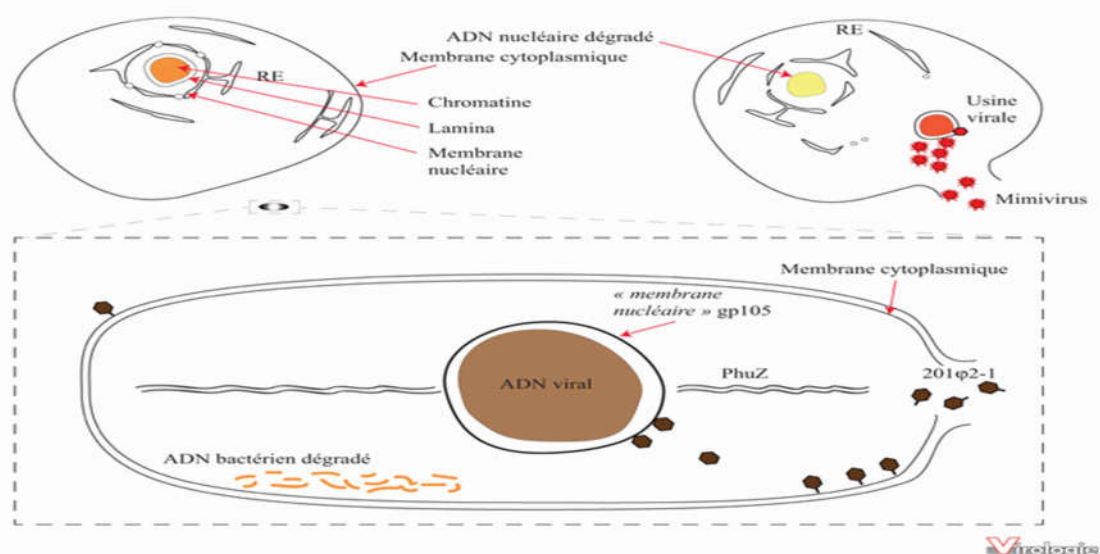


Figure 2. Structure et organisation d'une cellule bactérienne (Forterre et Raoult.2017).

III.4. Bactérie staphylococcuse

Le staphylocoque est une bactérie à Gram positif de la famille des Micrococcae IL possède une paroi cellulaire épaisse composée d'environ 50 % en poids de peptidoglycane (PGN). *S. aureus* se trouve couramment sous forme de bactérie commensale située superficiellement sur les narines antérieures humaines, son réservoir principal À partir des narines, la bactérie peut se propager à d'autres sites tels que la gorge, la peau, le vagin, le périnée et le tractus gastro-intestinal. Bien qu'il s'agisse d'un commensal, *S. aureus* EST bien équipé avec une variété de facteurs de virulence tels que comme les microcapsules, les toxines et les gènes de résistance aux médicaments qui contribuent à la pathologie (Brown *et al.* ,2014).

III.5. Bactérie Bacillus

Bacillus cereus est une bactérie Gram positive, aérobie, anaérobie facultative, sporulée et mésophile, avec des températures de croissance de 10 à 48 °C avec une croissance optimale entre 28 et 35 °C. C'est une espèce omniprésente, vivant comme saprophyte du sol mais également présente dans les aliments d'origine végétale et animale, notamment les produits laitiers

La capacité de cette espèce à se développer grâce à la nourriture peut poser de sérieux problèmes à l'industrie alimentaire, en particulier dans le secteur des produits laitiers. La présence de cette bactérie peut provoquer des modifications de la texture des aliments ou le développement de mauvais goûts en raison de la multiplication de cellules végétatives ou de la production de toxines. Le résultat final de ce processus est une intoxication alimentaire, pouvant provoquer des vomissements et (ou) de la diarrhée. Ces symptômes peuvent apparaître quelques heures après l'ingestion d'aliments contaminés, selon que le type de toxine est émétique (produit par la croissance de cellules dans l'aliment) ou diarrhéique (produit lors de la croissance végétative de *B. cereus* dans l'intestin grêle) (Granum et Baird-Parker 2000).

III.6. Bactérie Pseudomonas

Pseudomonas aeruginosa est un micro-organisme Gram négatif important impliqué dans les infections chez les brûlés dans le monde entier Les infections causées par cet agent pathogène sont difficiles à traiter en raison de leur niveau élevé de résistance aux médicaments et, par conséquent, des options thérapeutiques réduites. (Keila *et al.* 2017).

III.7. Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance antimicrobienne d'origine biologique, c'est-à-dire produite par un microorganisme (champignon microscopique et bactérie) ou par synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres microorganismes. (Boulaḥbal, 2006).

III.7.1. La résistance aux antibiotiques

- La résistance naturelle : Elle s'applique à toutes les souches d'une espèce bactérienne et existe avant l'utilisation des antibiotiques. Cette résistance est héritée des chromosomes et est transmissible de manière permanente aux cellules filles lors de la réplication bactérienne (Rougeaux, 2014).
- La résistance acquise : Elle n'affecte qu'une partie des souches d'une espèce bactérienne habituellement sensible et survient après l'antibiothérapie. Un nouveau mécanisme de résistance peut être acquis à la suite d'une mutation sur le chromosome bactérien ou d'une acquisition d'une information génétique provenant d'une bactérie déjà résistante (Rougeaux, 2014).

ChapitreIV :

Matériel et méthodes

IV.1. Matière végétale

La plante Bougainvillea a été récolté à M'sila, en Algérie, en mars 2024, et identifiée grâce au programme Pl@ntNet. Après la récolte, l'échantillon a été séché à température ambiante dans un endroit bien ventilé, à l'abri de la lumière.

IV.1.1 Matériel

Boîtes pétries en verre, Etuve, Bécher, Epprouvette, Erlenmeyer, Balance précise, Rotavapeur, Entonnoir, Papier filtre, Eppendorf, Tube à essai, Balance précise, Spectrophotomètre, Micropipette, Bain marie, Vortex, Centrifugeuse.

IV.1.2. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : méthanol, chlorure de sodium (NaCl) hydroxyde de sodium (NaOH), eau distillée, chloroforme, trichlorure d'aluminium $AlCl_3$, la quercétine, le Folin-Ciocalte, carbonate de sodium (Na_2CO_3), l'acide gallique, Tampon Tris-phosphate, BSA (Albumine de sérum bovin), L'eau physiologique sterile, Milieu MH (Muller Hinton), Diclofenac



Figure3. Bougainvillea (Kent *et.al.*2007)

IV.2. Extraction

- L'extraction appliquée consiste en une macération des poudres de parties de feuille Bougainvillea (50g). Dans méthanol pure (350 ml) et (150ml) eau distillée, sous agitation,

pendant 24h. Après décantation, le surnageant a été mis à évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur (Extrait methanolique). L'extraction appliquée consiste en une macération des poudres de parties de feuille Bougainvillea (50g). Dans eau distillée (500 ml), sous agitation, pendant 24h. Après décantation, le surnageant a été mis à évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur (Extrait aqueux). Ensuite on le met dans la Boîtes de pétri séchée dans l'incubateur a 40 °C 72 h. apres l'incubation en gratter l'extrait.

Le rendement d'extrait a été calculé par :

$$R (\%) = M / M_0 \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M₀ : Masse en gramme de matériel végétale à traiter.

IV.2.1. Dosage des polyphénols

Le dosage de polyphénols totaux dans notre extrait a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu suivant le protocole décrit par (Li *et al.* 2007). L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactifde Folin-Ciocalteu. Ce dernier est Constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des substances phénoliques, en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 750-760 nm. Elle est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques oxydés présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006). Mélanger 0.1 ml d'extrait (400 g/ml) avec 0.5 ml Folin-Ciocalteu (dilue 10 fois dans l'eau distillée). Après 4 min 0.4 ml d'une solution de carbonate de Na₂CO₃ (7.5%) a été ajouté au milieu réactionnel. Après 2h du l'incubation a la température ambiante l'absorbance doit mesurer dans 760 nm. La même procédure a été répéter avec le standard acide gallique a déférente concentration (20-200 mg/ μ l)

IV.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes correspondent à une vaste famille de composés naturels et sont les principaux représentants du groupe des phénols. On les qualifie de pigments presque universels des végétaux, produits par leur métabolisme secondaire. Environ 2% du carbone est estimé. Selon (Middleton *et al* Chithan. 1986).

Mettre 250 μ l d'extra it du planet dans un tube à essai ; ajouter μ l de solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à %, laisser incuber min à l'obscurité. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à nm. A. Calibrage en quercétine Réaliser par pesée une solution de quercétine (1mg/ml), puis par dilution des solutions filles.

Laisser incuber 10 min à l'obscurité. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 430 nm.

IV.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro

IV.3.1 Test de la dénaturation thermique des protéines

Préparations des solutions

- Préparation du Tris-phosphate 0.5 M pH= 6,8

1g est dissous dans 200 ml de l'eau distillée. Le pH est par la suite ajusté à 6,8 avec Tris-phosphate.

-Préparation de la solution BSA :

100 mg de BSA est dissoute dans 50 ml de tampon Tris-phosphate

Mode opératoire

0,5 ml de chaque extrait concentré ou standard (Diclofenac 75 mg), 0,5 ml de solution de BSA (0,2%) préparée en Tris-phosphate (pH= 6,8) a été ajouté. Les échantillons ont été incubés au four à 37°C pendant 15 min puis immergés dans un bain-marie à 72°C pendant 5 min. Après refroidissement des tubes, la turbidité (niveau de précipitation des protéines) a été mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

- Échantillon : 0,5 ml d'extrait + 0,5 ml de BSA

- Blanc : 0,5 ml d'extrait + 0,5 ml de Tris-phosphate (pH : 6,8)

- Control : 0.5 H₂O + 0.5 ml BSA

$\% I = ((\text{control} - (\text{chantillon} - \text{Blanc})) / \text{control}) \cdot 100$

IV.4. Evaluation de l'Activité antibactérienne

Le but de cette manipulation est la détermination l'effet antibactérienne de l'échantillone (extrait aqueux et extrait méthanolique) par la méthode de diffusion en milieu solide a partir d'un disque de papier Wattman N°01.

IV.4.1. Les souches bactériennes testées

Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries : les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif.

- **Bactéries gram positif (Gram +) '**

Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis.

- **Bactéries gram négatif (Gram -)**

Pseudomonas aeruginosa.

IV.4.2. Méthodes

IV.4.2.1. Détermination de l'activité antibactérienne

▪ Mode opératoire

1. Stérilisation du matériel

Dans la partie microbiologique, nous avons besoin non-seulement de la propreté, mais aussi de respecter les conditions d'asepsie et de stérilisation. C'est pour cette raison nous avons enrobé le matériel utilisé suivant, dans un papier aluminium, et le stérilisé dans un autoclave à 121 °C.

2. Préparation des disques

Le papier filtre approprié à cette étude est papier Wattman. Il est découpé en disques circulaires mesurant environ 6 mm de diamètre, ce qui permet d'obtenir une zone d'inhibition facilement mesurable. Après avoir préparé les disques, ils sont placés dans un tube à essai et stérilisés dans un autoclave.

3. Préparation de milieu de culture

Le contexte culturel adapté à cette étude est celui de Muller-Hinton. Dans un bain Marie, la gélose doit être bouillie jusqu'à ce qu'elle soit complètement dissoute. Il est essentiel de procéder à une stérilisation à l'autoclave avant d'être utilisé. Finalement, verser l'intérieur des boîtes de pétri et laisser refroidir et se solidifier à température ambiante pendant 10 à 15 minutes.

4. Préparation des solutions d'extrait de plante de Bougainvillea :

Dans 500 µl d'eau distillée, on a mélangé 200 µg d'extraits méthanoliques et 200 µg d'extrait aqueux.

5. Préparation de la suspension bactérienne

À partir d'une culture jeune de 24h sur GN, trois colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques ont été raclées à l'aide d'une anse de platine stérile qui ont été par la suite déchargées dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9. La suspension bactérienne ainsi préparée est homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une

adsorption de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort (0,8 à 1 ab)

6. Ensemencement

Dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum, un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne. Puis on l'essor en le pressant fermement contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum. L'écouvillon est frotté trois fois sur toute la surface gélosée, en tournant chaque fois la Boîtes de 60°C de façon à assurer un ensemencement uniforme.

7. Méthode de diffusion en milieu solide

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (milieu Muller- Hinton) pour l'activité antibactérienne. De ce fait, à l'aide d'une pince stérile, chacun des disques de papier Wattman stérile N°1 et de diamètre 6 mm est imprégné par 15 µl d'huile essentielle à des concentrations de 100, 50, 25 mg /ml. Placé les disques à côté de la surface du milieu de la Boîtes de pétri en présence au milieu un disque imbibé par l'eau distillée (témoins négatifs). Incubées les boîtes à 37°C pendant 24 h pour les bactéries. La détermination de l'activité antibactérienne est estimée par la mesure. À l'aide d'une règle, du diamètre (mm) de la zone d'inhibition. (Chaque expérience est répétée trois fois, en même temps et au même endroit).

Chapitre V:
Résultats
Et
Discussion

Chapitre V. Résultats et discussion**V.1. Rendements d'extraction**

L'extraction du Bougainvillea permet d'obtenir un extrait sous forme de poudre. L'extraction par trempage de la poudre de fleurs sèches de Bougainvillea dans le méthanol a donné un résidu d'extrait brut sec avec un rendement de 23,076 %, tandis que le trempage dans l'eau distillée a donné un résidu d'extrait brut sec avec un rendement de 12,86 %, qui a été déterminé pour 50 g de matériel végétal sec selon la formule suivante :

Les résultats sont représentés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Analyses quantitatives de l'extrait de Bougainvillea

	E Meth	E aq
Rendement (%)	23.076%	12.86%
Polyphénol (μg EAG/mg E)	68.488 \pm 0.42	66.660 \pm 0.45
Flavonoïde (μg EQ/mg E)	70.09 \pm 0.51	62.460 \pm 0.58

L'extraction est améliorée en utilisant des plantes sous forme de poudre, car cela permet à l'échantillon de devenir plus homogène, Pour accroître la surface de contact avec le solvant et rendre la pénétration plus facile à l'intérieur des cellules (Khoddami *et al.* 2013).

Ces rendements montrent clairement une augmentation des composés phénoliques totaux lorsqu'on choisit un solvant organique (méthanol). Ces solvants se révèlent être parfaits et sélectifs.

En raison de la capacité du méthanol à augmenter la perméabilité des parois cellulaires et à faciliter l'extraction de nombreux composés bioactifs, tels que les composés phénoliques, il est possible d'extraire un grand nombre de composés hautement polaires, ainsi que des composés de polarité moyenne et faible (Seidel, 2006 ; Mohammedi et Atik, 2011).

V.2. Dosage de polyphénol et flavonoïde

V.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur totale en polyphénols dans les extraits aqueux et méthanoliques a été effectuée à l'aide de la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu. Les extraits préparés ont été analysés quantitativement à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

La courbe montre la linéarité de l'absorbance pour différentes concentrations. La quantité de polyphénols présents dans l'extrait a été rapportée en équivalents grammes d'acide gallique et a été déterminée par l'équation présentée dans :

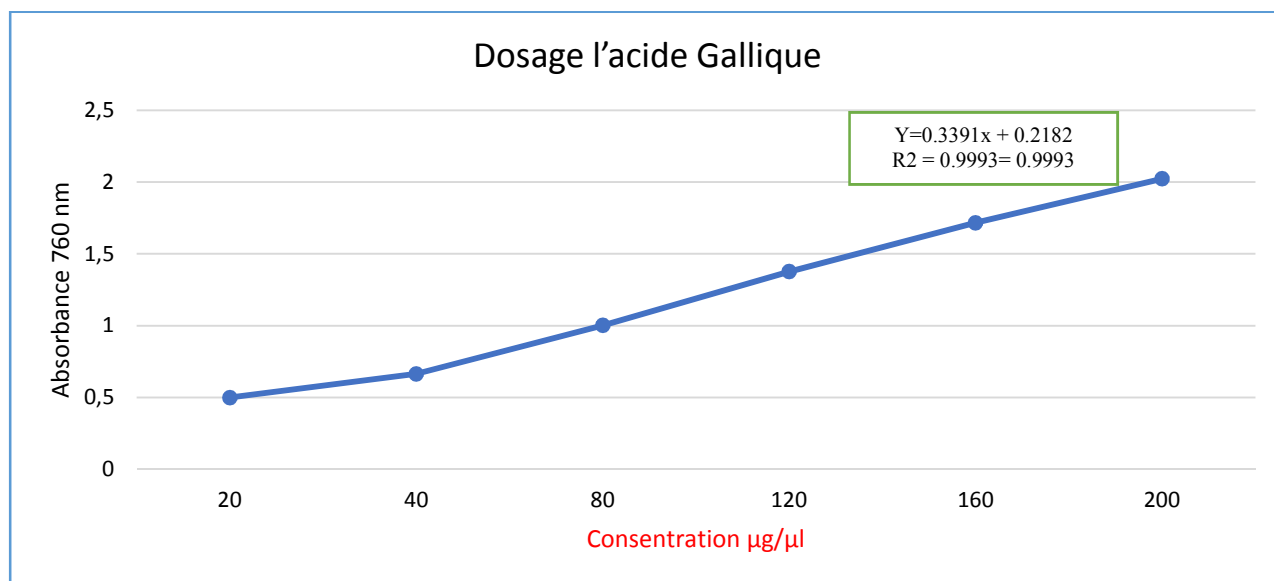


Figure 4. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La teneur totale en polyphénols de notre extrait méthanolique de *Bougainvillea* est de 68,488 EAGmg/g d'extrait. La teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux de notre fleur de *Bougainvillea* est de 66,660 EAGmg/g d'extrait. Le résultat obtenu pour la teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux est inférieur au résultat obtenu pour la teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique.

Les extraits méthanoliques et aqueux ont été trempés dans de l'eau distillée et du méthanol respectivement à température ambiante pendant 24 heures.

V.2.2. Teneur en flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes de l'extrait a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant du chlorure d'aluminium (AlCl₃).

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide de chlorure d'aluminium (AlCl₃), l'extrait étant exprimé en équivalent quercétine/g de plante sèche.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux est = 62,46 obtenue à partir du matériel végétal sec.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique est = 70,09, obtenue à partir du matériel végétal sec.

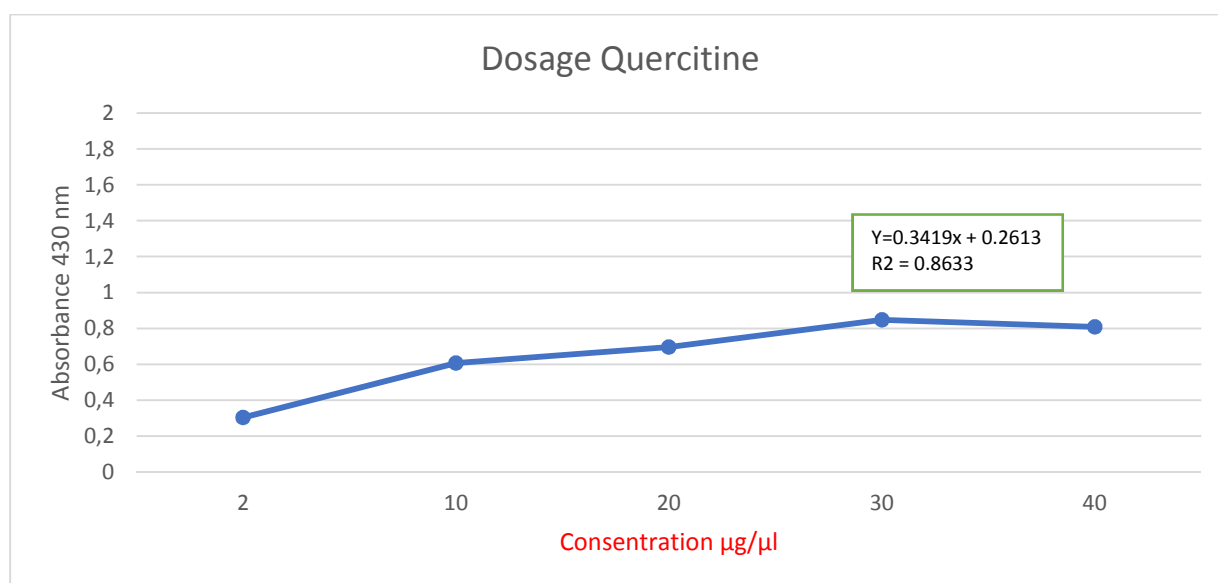


Figure 5. Courbe d'étalonnage de la Quercitine.

La teneur totale en flavonoïdes de l'extrait méthanolique de Bougainvillea est de 62,46EAGmg/g d'extrait aqueux.

La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait aqueux de fleur de Bougainvillea est de 70,09 de l'extrait aqueux.

Le résultat obtenu pour la teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait aqueux est beaucoup plus faible que le résultat obtenu pour la teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique.

Les extraits méthanolique et aqueux ont été trempés dans de l'eau distillée et du méthanol respectivement à température ambiante pendant 24 heures.

En comparant les résultats obtenus, la teneur en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique est supérieure à celle de l'extrait aqueux.

V.3. L'activité anti-inflammatoire et antibactérienne

V.3.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Les résultats de l'effet protecteur de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux de fleurs de Bougainvillea contre la dénaturation des protéines induite par la chaleur sont présentés.

La dénaturation induite par la chaleur est illustrée dans la figure suivante :

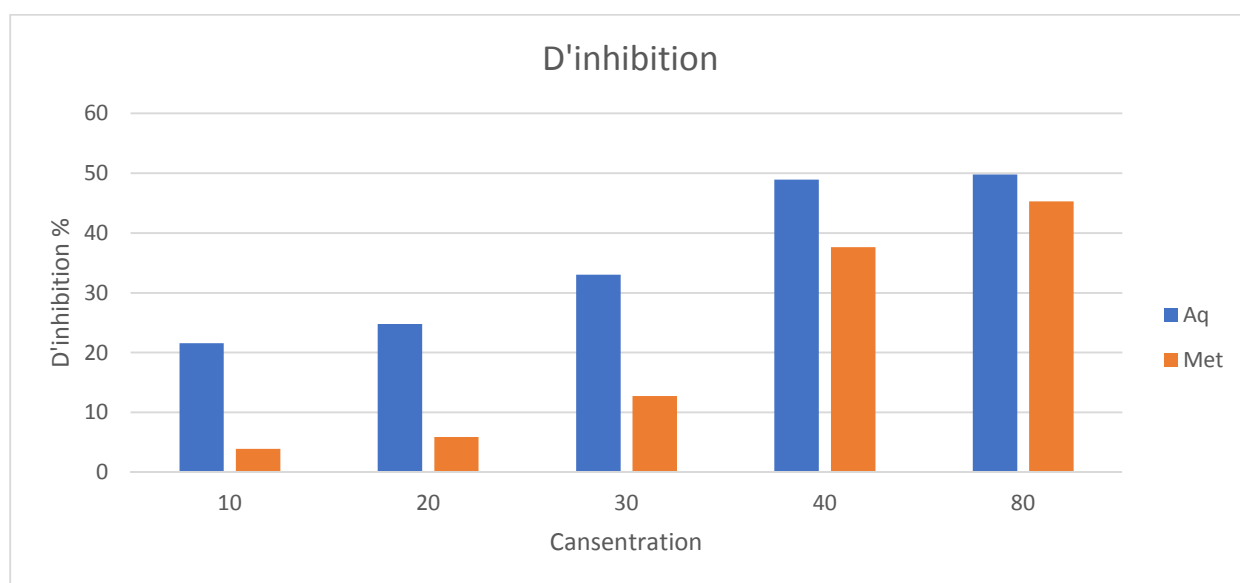


Figure 6. L'effet de l'extrait aqueux (Aq) et méthanolique (Met) sur l'inhibition de la dénaturation des protéines

Il est observé que les extraits aqueux et méthanoliques de Bougainvillea renferment des composés.

Les conclusions sont favorables. L'extrait aqueux présente une inhibition de la dénaturation des protéines maximale de 49,80 % à 80 µg/ml, tandis que l'extrait méthanolique présente une inhibition de 45,29 %.

Les extraits aqueux et méthanoliques de la fleur de bougainvillea présentent des activités anti-inflammatoires distinctes, car les résultats obtenus montrent une inhibition de la dénaturation des protéines de 45,29% dans l'extrait en solution aqueuse.

L'inhibition la dénaturation des protéines de l'extrait aqueux est plus élevée.

Analyse des résultats obtenus en comparaison avec ceux de l'étude (Daouadi.2017). Le taux de résistance au Diclofenac sodique est de 94,22%.

Il y a une différence significative entre les pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et méthanolique et du Diclofénac sodique, ce qui signifie que les résultats obtenus dans notre étude sont plutôt moyens, contrairement aux résultats d'inhibition obtenus dans l'étude (Fnides Khadidja.*et al.*2018) où le pourcentage d'inhibition était de 65,86%, ce qui est un pourcentage élevé de Diclofénac sodique.

V.3.2. Évaluation de l'activité antibactérienne



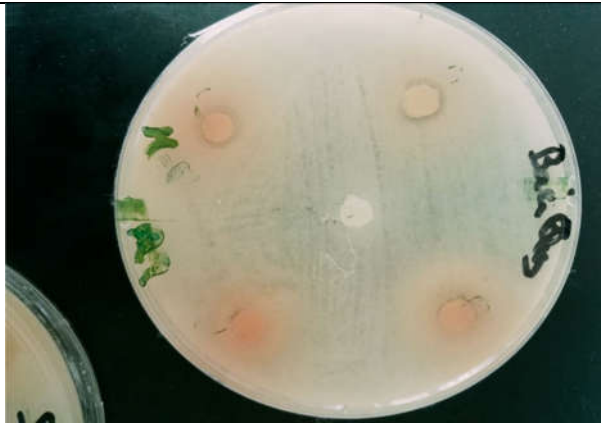


Figure7. L'effet de l'extrait aqueux et méthanolique sur les bactéries

Bougainvillea a été largement utilisé en médecine traditionnelle pour traiter les maladies respiratoires telles que la toux, l'asthme, la bronchite et les maladies gastro-intestinales, et il est également antibactérien et insecticide, mais il n'y avait pas de potentiel antimicrobien dans cette étude, malgré la recherche montrant la présence de produits phytochimiques élevés tels que les alcanes, les phénols, les terpènes et les terpènes (Ornelas G, Ingrid G., et al.2023)

L'extrait aqueux et méthanolique de *Bougainvillea glabra* a montré un effet inhibiteur contre toutes les bactéries Gram-positives et Gram-négatives à l'exception de *Bacillus* car chaque médicament a son propre spectre contre les micro-organismes. *Bougainvillea glabra* a montré un effet inhibiteur sur toutes les bactéries Gram-négatives et Gram-positives sélectionnées pour la présente étude, à l'exception de *Bacillus* (Gupta *et al.*, 2009). Le but de cette étude était d'évaluer et de comparer l'activité antibactérienne de l'extrait de feuille de *Bougainvillea* avec l'extrait de feuille de *Bougainvillea glabra*. Les souches bactériennes utilisées dans l'étude étaient *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* et *Vibrio cholerae*. L'extrait aqueux et méthanolique était plus actif contre toutes les bactéries. *B. Glabra* était inactif contre *Bacillus*, (Kalaiyarasan *et al.*, 2015)

Conclusion

Conclusion

Cette étude vise à tester l'efficacité de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux de la plante bougainvillée. Bien que de nombreuses études aient été réalisées sur l'activité pharmacologique du bougainvillier, cette plante possède un potentiel anti-inflammatoire.

Dans cette étude, les fleurs de bougainvilliers sont utilisées comme ingrédients dans de nombreuses boissons, desserts et autres médicaments au Mexique pour soulager les symptômes des infections respiratoires telles que la toux et les maux de gorge.

Nous avons obtenu des résultats quantitatifs et qualitatifs différents de ces autres études. Cela met en évidence la diversité des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires des plantes et leur effet sur différents agents.

Références

Bibliographique

Références bibliographique

- Ansar, W., & Ghosh, S. (2016). Biology of C reactive protein in health and disease. In *Biology of C Reactive Protein in Health and Disease*.
- Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., Coppolino, MF. (2012). Clinical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Anti-inflammatory Anti-allergy, Agents Med Chem*, (11): 52-64.
- Boudjouref M., 2011- Etude de l'activité antioxydant et antimicrobienne d'extraits
- Boulahbal F. (2006). Microbiologie S1 clinique. Office des publications universitaires. Alger. 5^{ème} édition. 173pp.liver.
- Brown, A.F.; Leech, J.M.; Rogers, T.R.; McLoughlin, R.M 2014. Staphylococcus aureus colonization: Modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Front. Immunol* 4, 507. Article
- Bruneton J. (2009) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris ; Cachan : Éd. Tec & doc ; Éd. Médicales internationales.liver
- Cardile S, Martinelli M, Barabino A, Gandullia P, Oliva S, Di Nardo G, et al (2016). Italian survey on non-steroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal bleeding in *Gastroenterol.*;22(5):1877-83.
- Charles, N. S., Peter, A. W. & Derek, W. G. (2010). Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press*, 2-3.
- Chen, L.F. The changing epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: 50 years of a superbug.
- Christopher Blake. Mathilde Nordgaard Christensen and Ákos T. Kovác 2020 .Published Online: 10 Nov 2020 Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by Bacillus subtilis
- Cofer, (2010) Collège Français des Enseignants en Rhumatologie. Item 174 : Prescription et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens
- Cumo, C. (2013). Encyclopedia of cultivated plants: From Acacia to zinnia. United States : ABC-CLIO.
- Dr Oliver. Rougeaux. 20 avril 2014. Infectiologie, Center hospitalier de Chambéry, France.
- Edwin, E., Sheeja, E., Toppo, E., Tiwari, V., and Dutt, K. R. (2007). Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy). *Ars Pharm.* 48 (2), 135–144.

- Enciso-Díaz, O. J., Méndez-Gutiérrez, A., De Jesús, L. H., Sharma, A., Villarreal, M. L., and Taketa, A. C. (2012). Antibacterial activity of *Bougainvillea glabra*, *Eucalyptus globulus*, *Gnaphalium attenuatum*, and propolis collected in Mexico. *Pharmacol. Pharm.* 03 (04), 433–438. Doi:10.4236/pp.2012.34058.
- Flandrois Jp, 2000. Bactériologie Médicale Coll Azay puf.
- Fnides Khadidja. Bensalem Ibtissem. Khirdine Saida. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut. université 8 Mai 1955. Guelma. 2018.
- Forterre, P., & Raoult, D. (2017). La transformation d'une bactérie en cellule virale à noyau relance l'hypothèse de l'eucaryogenèse virale. *Virologie*, 21(4), 157-159.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., and Amiot, M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived product, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1370-1373.
- Granum, P.E., and Baird-Parker, T.C. 2000. *Bacillus* spp. In *The microbiological safety and quality of food. Edited by B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, and G.W. Gould.* Aspen Publishers, Maryland. Pp. 1029–103.
- Gupta V, George M, Joseph L, Singhal M, Singh H.P. 2009 Evaluation of antibacterial activity of *Bougainvillea glabra* 'snow white' and *Bougainvillea glabra* *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1): 233-237.
- Gupta, V., George, M., Joseph, L., Singhal, M., and Singh, H. P. (2009). Evaluation of antibacterial activity of *Bougainvillea glabra* 'snow white' and *Bougainvillea glabra* 'Choisy'. *J. Chem. Pharm. Res.* 1 (1), 233–237.
- Hammad Saleem, Atif Usman, Mohamad Fawzi Mahomoodally Nafees Ahema 2021, *Bougainvillea glabra* (choisy): A comprehensive review on botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 266, 10 February 2021, 113356)
- He, M., Wang, X., Zhuang, Y., and Jin, X. (2020). The complete chloroplast genome of *Bougainvillea glabra*. *Mitochondrial DNA Part B* 5 (1), 889–890.
- Heart T. Shears P2006. Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences-Flammarion.
- Henzen, C. (2003). Traitement aux glucocorticoïdes : risques et effets secondaires. In *Schweiz Med Forum* (Vol. 19, pp. 442-6).
- Heymonet, C. (2013). Les plantes à visée anti-inflammatoire utilisées en phytothérapie.
- Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale*. Edition Debock et lancier. Pp 276.

- Hörl WH. (2010); Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Kidney. *Pharmaceuticals*. 3(7):2291-321. <https://www.amazon.fr/Immunopathologie-r%C3%A9actions-inflammatoires-Inflammatoires>. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
- Houmènou V, Adjatin A, Assogba F, Gbénou J, Akoègninou A 2018. Etude Phytochimique Et De Cytotoxicité De Quelques Plantes Utilisées Dans Le Traitement De La Stérilité Féminine Au Sud-Bénin. *Eur Sci J ESJ*. ;14(6):156.
- Jackson, L., and Evers, B.M. (2006). Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers, in : *The link between inflammation and cancer*. Springer US, vol, 130, P, 39-65.
- Jain, P., Pandey, R., & Shukla, S. S. (2015). *Inflammation : Natural resources and its applications* (No. 11619). Springer India.
- Kada Seoussen, (2018). Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences, Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques, Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 13.
- Kaisoon, O., Konczak, I., and Siriamornpun, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Res. Int.* 46 (2), 563–571. Doi:10.1016/j.foodres.2011.06.016.
- Keila de Cássia. de Almeida Silva et al (2017). Molecular characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center *Burns*.
- Kent D. Kobayashi, James McConnell, and John Griffis 2007 Department of Tropical Plant and Soil Sciences, 1 University of Guam *Ornamentals and Flowers*.
- Koehlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Krishna DR, Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR 2001. *Indian Journal of Pharmacology* 33: 2-16
- Krishna S, Bustamante L, Haynes RK, Staines HM 2008. Artemisinins: their growing importance in medicine. Vol. 29, *Trends in Pharmacological Sciences*. P. 520–7.
- Krishna, R. G., and Sundararajan, R. (2020). Toxicity studies of *Bougainvillea glabra* and *Mucuna pruriens*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 11 (10), 4910–4917. Doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.
- Kumar, V., Abul, K. A., Nelson, F., Richard, M. (2007). *Robbins Basic Pathology*, 8th.

- Ladoh-Yemeda C, Vandi T, Dibong S, Mpondo Mpondo E, Wansi J, Betti J, et al 2016. Étude ethnobotanique des plantes médicinales commercialisées dans les marchés de la ville de Douala, Cameroun. *J Appl Biosci.* 2016; 99(1) :9450-9466
- Lim, T. K. (2014). *Edible medicinal and non-medicinal plants*. Netherlands : Springer Dordrecht. Doi : 10.1007/978-94-017-8748-2_33.
- Liu, F., & Rabinovich, G. A. (2010). <Liu_2010_Galectins2.pdf>. 1183, 158–182.
- Lowy, F.D. Staphylococcus aureus infections. *N. Engl. J. Med.* 1998, 339, 520-532
- Mansour Sadia, (2015). Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Science, Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : Artemisia absinthium L, Artemisia herba alba Assoet Hypericum scarboides – Etude in vivo-, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF, 18.
- Matyas, C. ; Ackzell, I. ; Samuel, CJA. (2003). Pinus sylvestris –Lignes directrices techniques pour la conservation genetique et l'utilisation pour le pin sylvestre.
- Matyas, C.; Ackzell, I. ; Samuel, CJA. (2003). Pinus sylvestris –Lignes directrices techniques pour la conservation génétique et l'utilisation pour le pin sylvestre. *Mechanisms. Clinical science*, 94(6), 557-572. medicinal plants ». *Phytochemistry Reviews* 19 (5) : 1199-1209.
- medicinal plants ». *Phytochemistry Reviews* 19 (5) : 1199–1209.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an oldflame. *Cell*, 140(6), 771-776.
- Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, et al. Complement system part I. Molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* 2015; 6: 262
- Mozina Sonja smole, Kurincic Marija, Klancnik Anja, Marvi Ana, 2011. Campylobacter et sa multi-résistance dans la chaine alimentaire. *Tendances en science et technologie ali-mentaires* 22.2-3/91-98
- Muster D. (2005) -Médicaments de l'inflammation. Edition Elsevier. P 21-29.
- Nagata N, Niikura R, Yamada A, Sakurai T, Shimbo T, Kobayashi Y, et al. (2016) AcuteMiddleGastrointestinalBleedingRisk Associated withNSAIDs, AntithromboticDrugs, and PPIs: A Multicenter Case-Control Study. *PloS ONE* 11(3): e0151332.
- Napoleón, A., Swetha, S., and Angajala, G. (2013). In-vitro antioxidant and antibacterial studies of betacyanin isolated from the bracts of Bougainvillea glabra. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5 (4), 84–87.

- Ndiaye M., Sy G., Dièye A., Touré M. et Faye B, 2006. Evaluation de L'activité Anti-inflammatoire de feuilles d'*Annona Reticulata* (Annonaceae) Sur l'oedème aigu de la patte
Références bibliographiques 45 de rat induit par la carragénine, 2006. *J. Pharm. Méd, Trad, Afr.*
Vol. 14, p.179-186. of *Pharmaceutical Research*, 14, 131-140
- Noack, M. et Kolopp-Sarda, M. N. (2018). Cytokines et inflammation : physiologie,
- Ogunwande, I. A., Avoseh, O. N., Olasunkanmi, K. N., Lawal, O. A., Ascrizzi, R., and Flamini, G. (2019). Chemical composition, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of *Bougainvillea glabra*. *J. Ethnopharmacol.* 232, 188–192. Doi : 10.1016/j.jep.2018.12.017.
- Ornelas García, Ingrid G., et al. "Bougainvillea glabra Choisy (Nyctinaginacea): review of phytochemistry and antimicrobial potential." *Frontiers in Chemistry* 11 (2023): 1276514
- Risser, A., Donovan, D., Heintzman, J., & Page, T. (2009). NSAID prescribing precautions. *American family physician*, 80(12), 1371-8.
- Ronald Bentley, JW Bennett *Advances in applied microbiology* 52, 303-332, 2003.
- Russell R. (2001) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal damage—problems and solutions. *Postgrad Med J.* Feb; 77(904):82-8.
- Sahu and J. Saxena, 2012. "Bougainvillea glabra a Natural Antioxidant A Review," *Chemistry*, vol. 46, pp. 4113–4117.
- Schlaepfer, L., and García, B. (2017). *Las flores de Casa libertad : Colecta vegetal*. México : Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
- Seema Yuvraj Mendhekar*, Pooja Sharad Bhujbal, Vishakha Vikas Shinde, S. L.Jadhav and D. D. Gaikwad 2018 Vol 7, Issue 1. *Pharmacognostic, Phytochemical, Physicochemical and TLC Profile Study of Leaves Bougainvillea Glabra Choisy (Nyctaginaceae)*.
- Serhan, C. N. (2017). *Treating inflammation and infection in the 21st century : new hints from decoding resolution mediators and mechanisms*. 1–17.
- Serhan, C. N., Ward, P. A., & Gilroy, D. W. (2010). *Fundamentals of inflammation*. Cambridge University Press.
- Shalini, M., Aminah, A., Khalid, H., Vimala, S., Katherine, S., and Khoo, M. (2018). In-vitro antioxidant activities, phytoconstituent and toxicity evaluation of local *Bougainvillea glabra* bract (bunga kertas). *Int. J. ChemTech Res.* 11 (09), 22–30. doi:10.20902/IJCTR.2018.110904.
- Süntar, Ipek. 2020. « Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery : role of

Taïba Iman, Boumahrat Meriem, Boulifa Asm, (2017). Evaluation de l'activité anti inflammatoire, analgésique, antioxydante et antipyrétique de la plante médicinale Algérienne *Salvia Officinalis*.L,unv de constantine,4.

Tangara D. Diop A, Tirera H, Yaranga B, Diop M 2022. Plante médicinale sénégalaise: dosage des compositions nutritionnelles et caractérisation des phytochimiques de *verticillata*. 2022:172:10. Borreria

Thiéfin G. (2003) Complications gastro-intestinales des anti-inflammatoires non stéroïdiens et de l'aspirine à faible dose. *Gastroentérologie Clin Biol.* ; 27(5) :498-510.

V. Kalaiyarasan, C. Kalaiselvi, C.Jothimanivannan, M. Sakthivel, S. Subash Varma, J. Tamil Selvan, 2015, Pharmacological Activities of *Bougainvillea Glabra*-a Review, *WORLD Journal of Pharmaceutical Research* SJIF Impact Factor 8.084 Volume 11, Issue 13, 1023-1029).

Weill, B., Batteux, F. & Dhainaut, J. (2003). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23. 28-37.

Werth Brian J. 2020. Pharm D, University of Washington School of pharmacy

Wichtl M, Anton R. (2003) *Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et*

Wichtl M, Anton R. (2003) *Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Paris

