



HAL
open science

Contrôle des ravageurs de cultures par les ennemis naturels : la plante hôte facteur régulateur du système immunitaire des chenilles de vers de la grappe

Fanny Vogelweith, Denis Thiéry, Yannick Moret, Jérôme Moreau

► To cite this version:

Fanny Vogelweith, Denis Thiéry, Yannick Moret, Jérôme Moreau. Contrôle des ravageurs de cultures par les ennemis naturels : la plante hôte facteur régulateur du système immunitaire des chenilles de vers de la grappe. Cahier des Techniques de l'INRA, 2013, 78 (1), pp.10. hal-01119083

HAL Id: hal-01119083

<https://hal.science/hal-01119083v1>

Submitted on 4 Jul 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

CONTRÔLE DES RAVAGEURS DE CULTURES PAR LES ENNEMIS NATURELS : LA PLANTE HÔTE FACTEUR REGULATEURS DU SYSTEME IMMUNITAIRE DES CHENILLES DE VERS DE LA GRAPPE

Fanny Vogelweith¹, Denis Thiéry^{2,3}, Yannick Moret¹ et Jérôme Moreau¹

Résumé. En raison des nombreux dégâts occasionnés par les vers de la grappe dans les vignobles, trouver un moyen de lutte efficace est devenu un réel challenge. A l'heure actuelle, la lutte biologique apparaît comme une alternative possible à la lutte chimique. Cependant, les résultats obtenus suite aux lâchers de parasitoïdes sont extrêmement variables dans leur efficacité. Des études approfondies de la biologie des vers de la grappe et de leurs parasitoïdes sont donc nécessaires afin d'affiner les méthodes de lutte biologique. Le système immunitaire des insectes représente la dernière ligne de défense des phytophages contre les parasitoïdes. Dans cette étude nous mettons en évidence l'influence du cépage de vigne, à la fois sur les défenses immunitaires et sur le taux de parasitisme des vers de la grappe par des parasitoïdes. Ces résultats suggèrent alors qu'il est important de tenir compte de l'immunité du ravageur dans les programmes de luttés biologiques. En effet, comme certains cépages réduisent ou augmentent l'expression de certains effecteurs immunitaires clés des ravageurs, l'efficacité des agents biologiques visant à lutter contre ces derniers peut être compromise ou améliorée selon les cas. Par conséquent, pour une efficacité de lutte maximale, le choix des agents biologiques de contrôle de ravageurs de la vigne dépendra du cépage de vigne considéré.

Mots clés : cépage de vigne, immunité des insectes, interactions tri-trophiques, parasitoïdes, vers de la grappe

Les tordeuses de la vigne, Eudémis (*Lobesia botrana*) et Cochylis (*Eupoecilia ambiguella*) (Lepidoptera : Tortricidae), sont deux papillons dont les chenilles causent de nombreux dégâts dans les vignobles en l'absence de contrôles sérieux. Depuis plusieurs années, la viticulture française s'est clairement engagée dans une perspective de réduction des intrants phytosanitaires. Ainsi, le contrôle des populations de ces deux ravageurs commence à passer par l'intermédiaire d'un développement des méthodes biotechniques de lutte (confusion sexuelle) (Thiéry et Delbac, 2011 ; Fabre-Nys et Thiéry, 2012) ainsi que par le développement de la lutte biologique (*Bt*) (Ifoulis et Savopoulou-Soultani, 2004).

Actuellement, la lutte biologique dirigée par des lâchers d'auxiliaires (prédateurs, parasites, parasitoïdes) est très peu utilisée. En France, notamment en Alsace, d'importants lâchers de parasitoïdes des œufs de tordeuses de la vigne, tels que les Trichogrammes (Hymenoptera : Trichogrammatidae), ont été effectués pour tenter de contrôler des populations de ces ravageurs. Cependant, l'efficacité de cette méthode de lutte fut très variable et a compté de nombreux échecs (Barnay, 1999 ; Hommay et al., 2002 ; Thiéry et al., 2011). L'influence de

¹ UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Ecologie Evolutive, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon

² INRA-UMR1065 Save, ISVV, B.P.81, F-33883 Villenave d'Ornon

³ Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1065 Save, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon

Correspondance Fanny.Vogelweith@u-bourgogne.fr

nombreux facteurs non contrôlés peut expliquer ces résultats décevants. En effet, le succès parasitaire des Trichogrammes dépend de nombreuses variables environnementales abiotiques (telles l'humidité, la photopériode, la température...) mais aussi biotiques (comme la taille des œufs du ravageur, la plante hôte sur laquelle s'est développé le ravageur...) (Moreau et al., 2009). Dans certains vignobles, les auxiliaires naturels semblent effectuer un contrôle efficace des ravageurs mais celui-ci est souvent mal quantifié. D'anciens écrits scientifiques (Audouin, 1842, cité dans Thiéry, 2008) font d'ailleurs état de l'efficacité des auxiliaires pour réguler les populations de tordeuses de la vigne. Malgré les fortes pressions répétées des traitements insecticides durant des décennies, des populations de parasitoïdes se sont tout de même maintenues (Thiéry, 2008). Ainsi, des espèces de parasitoïdes larvaires très efficaces depuis de nombreuses années n'ont jamais disparu, à l'image de *Campoplex capitator* (Hymenoptera : Ichneumonidae) espèce majeure en 1912 dans le vignoble français. Il est donc légitime de penser que ces espèces répandues représentent un élément évolutif important par leur pression insecticide (elle tue sa chenille hôte) qu'elle exerce sur les tordeuses de la vigne. Des études récentes ont montré que le parasitisme des chenilles varie de manière parfois impressionnante selon les différents vignobles (Moreau et al., 2010 ; Vogelweith et al., 2011). De plus, la sensibilité des chenilles au parasitisme peut elle aussi varier.

Le système immunitaire est une des dernières lignes de défense des insectes phytophages contre leurs ennemis naturels (parasitoïdes, nématodes, champignons entomopathogènes...). Il paraît alors important de l'étudier et de quantifier sa capacité de variation pour comprendre l'origine de la variation du succès parasitaire des auxiliaires. La nutrition joue un rôle prépondérant dans l'expression des défenses immunitaires et la résistance aux parasites (Ponton et al., 2011). Par conséquent, s'intéresser à l'influence des cépages de vigne, comme ressource alimentaire, sur lesquels les insectes phytophages se développent devient incontournable pour mieux comprendre l'origine de la variabilité naturelle de la résistance au parasitisme chez les ravageurs. Cet intérêt pour l'étude de l'influence de la plante hôte sur le système immunitaire des insectes phytophages, est une approche originale qui est développée dans le cadre d'un projet de recherche collaboratif entre l'Université de Bourgogne à Dijon et l'Inra de Bordeaux.

L'objectif de nos travaux vise à déterminer, *in natura*, dans quelle mesure le cépage de vigne, sur lequel se développent les chenilles, peut influencer leur système immunitaire et par conséquent le succès de parasitisme des parasitoïdes. Nous présentons ici le protocole et les techniques choisies pour répondre à ce questionnement scientifique, ainsi que les résultats obtenus sur l'Eudémis de la vigne.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Choix des sites et échantillonnage des chenilles

Trois régions viticulturales françaises ont été échantillonnées en mai et juin 2011 (correspondant à la fin de la 1^{ère} génération des tordeuses de la vigne) : Alsace, Aquitaine, Provence-Alpes-Côte d'Azur. Dans chaque région, un ou deux vignobles ont été

échantillonnés : en Alsace, Cave de Beblenheim (CB) et Turckheim (TK) ; en Aquitaine, domaine Inra de la Grande Ferrade (DGF) ; et en Provence-Alpes-Côte d'Azur, domaine de Boisviel (DB) et plateau de Roquemartine (PR). Dans chaque vignoble, nous avons récoltés des chenilles d'Eudémis (*Lobesia botrana*) provenant de différents cépages de vigne : Arinornoa (ar), Cabernet Franc (cf), Cabernet Sauvignon (cs), Chardonnay (y), Cinsault (ci), Gewurztraminer (gw), Grenache (gr), Merlot (m), Pinot Gris (pg), Pinot Noir (pn), Riesling (rg).

Les chenilles d'Eudémis en fin de développement larvaire (5^e stade larvaire) ont été récoltées sur des ceps de vigne au stade de l'inflorescence, lorsque la densité de population de *L. botrana* était supérieure à 20 chenilles pour 100 grappes. Lors de la collecte, seuls les glomérules étaient prélevés, déposés dans des bacs (60 x 40 x 21,4 cm), puis maintenus au laboratoire dans les conditions suivantes : $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ d'humidité et une photopériode naturelle (**Figure 1**). Les chenilles sont ensuite retirées des glomérules pour les diverses mesures.



Figure 1. Photographie d'une chenille d'Eudémis (5^{ème} stade larvaire) dans un glomérule ouvert, le glomérule tissé de soie permettant à la chenille de se protéger lors de sa génération de printemps.

1.2. Mesure des paramètres immunitaires

Que sait-on du système immunitaire des insectes ?

Comme il a été mentionné précédemment, le système immunitaire est la dernière ligne de défense des insectes phytophages contre leurs ennemis naturels (parasitoïdes, nématodes, champignons entomopathogènes...). Par exemple, après l'injection d'un œuf par une femelle parasitoïde, celui-ci est immédiatement reconnu par les cellules immunitaires, les hémocytes (**Figure 2**). Les hémocytes s'agrègent à la surface du corps étranger pour former plusieurs couches cellulaires. Cette agrégation d'hémocytes s'accompagne souvent d'un dépôt de mélanine à la surface du corps étranger, formant ainsi une capsule mélanique (Cerenius and Söderhäll, 2004 ; Siva-Jothy et al., 2005 ; Strand, 2008). La synthèse de mélanine est assurée par l'enzyme phénoloxydase (PO) produite à partir de son précurseur inactif, la prophénoloxydase (PPO), stockées dans l'hémolymphe et les hémocytes (**Figure 2**). L'activité de la PO s'accompagne de la production de molécules cytotoxiques (quinones, phénols et radicaux oxygénés) qui participent à la neutralisation des pathogènes (Nappi et Ottaviani, 2000). Ainsi, il semble que plus le nombre d'hémocytes circulants est important,

plus la capacité des insectes à encapsuler un œuf de parasitoïde est forte (Fellowes et Godfray, 2000). La reconnaissance de micro-organismes tels que les bactéries et les champignons induit également la production d'un ensemble de peptides antimicrobiens (Figure 2). Ceux-ci sont produits et sécrétés dans l'hémolymphe par les hémocytes, le corps gras et les épithéliums. Cette ligne de défense inductible est plus spécifique mais aussi plus lente à mettre en œuvre. La production de ces facteurs antimicrobiens peut durer plusieurs jours selon l'espèce d'insecte concernée.

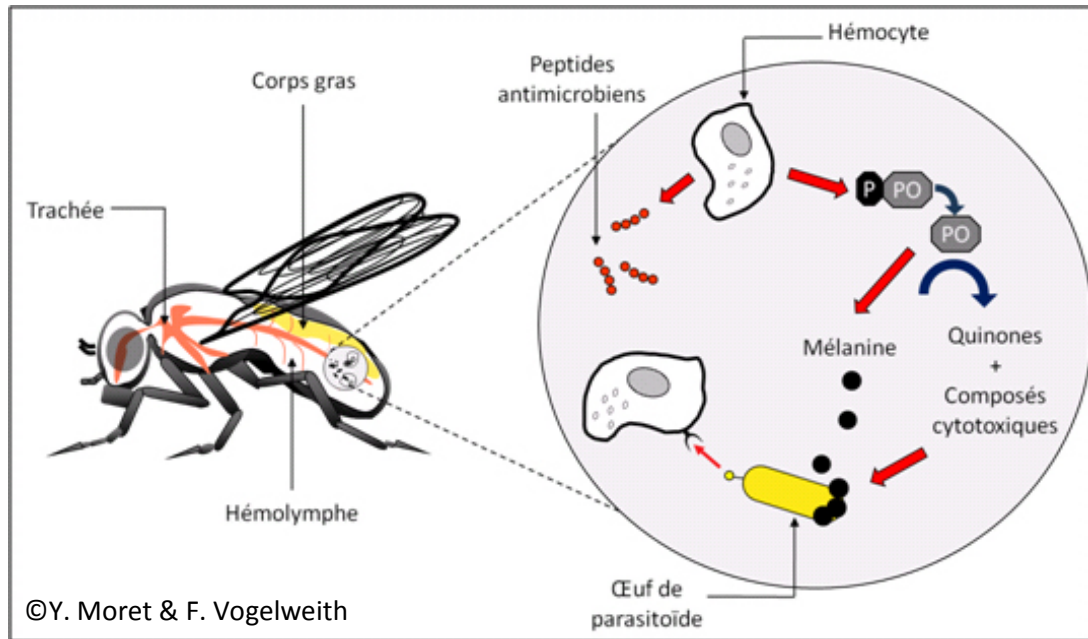


Figure 2. Schéma récapitulatif de la réponse immunitaire de la drosophile après l'injection d'un œuf de parasitoïde. Se référer au texte pour une explication des processus mis en œuvre.

Il a été montré que le système immunitaire est sous l'influence de nombreux facteurs biotiques et abiotiques notamment la qualité de nourriture consommée (Siva-Jothy et Thompson, 2002, Ponton et al., 2011 ; Vogelweith et al., 2011). Il s'avère que selon le cépage de vigne sur lequel les Tordeuses de la vigne s'alimentent, le taux de parasitisme par des parasitoïdes larvaires est différents (Moreau et al., 2010). En effet, dans cette étude *in natura* les auteurs ont montré que les larves issues du cépage Pinot Noir étaient plus parasitées que les larves issues du cépage Chasselas.

Une partie des chenilles récoltées a permis de mesurer des paramètres immunitaires. Afin de les estimer, de l'hémolymphe est prélevée sur chaque individu. Suite à ce prélèvement, la concentration des hémocytes circulants a été évaluée immédiatement sous microscope. Pour cela, de l'hémolymphe a été déposée sur une cellule de Neubauer grâce à laquelle le nombre total d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe a été calculé (Figure 3).

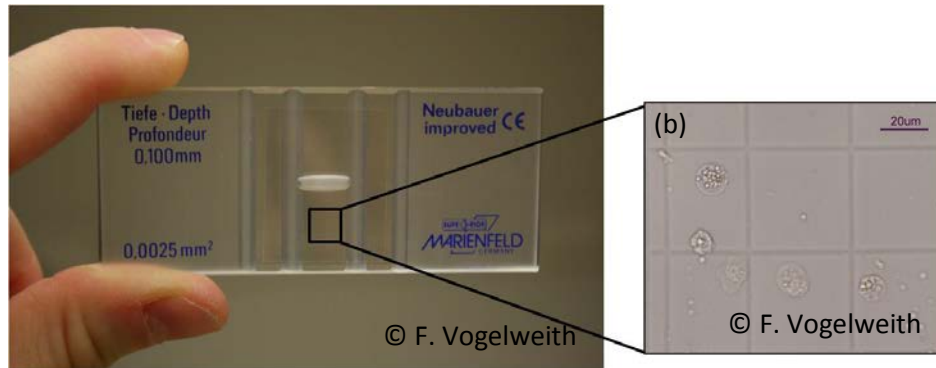


Figure 3. (a) Cellule de Neubauer telle qu'utilisée avec (b) un zoom sur une partie de celle-ci contenant cinq hémocytes, suite à un prélèvement d'hémolymphe sur une chenille d'Eudémis.

Par la suite, l'évaluation des activités enzymatiques de la PO et la PPO est réalisée par spectrophotométrie. Au cours de cette mesure, la concentration de ces enzymes est quantifiée par la vitesse de conversion de la dihydrophénylalanine (L-dopa) en dopaquinone des échantillons d'hémolymphe pendant 40 min (**Figure 4a**). L'activité enzymatique est déduite de la pente de la courbe de réaction durant sa phase linéaire (**Figure 4B**) et rapportée à l'activité enzymatique d'1 µL d'hémolymphe pure.

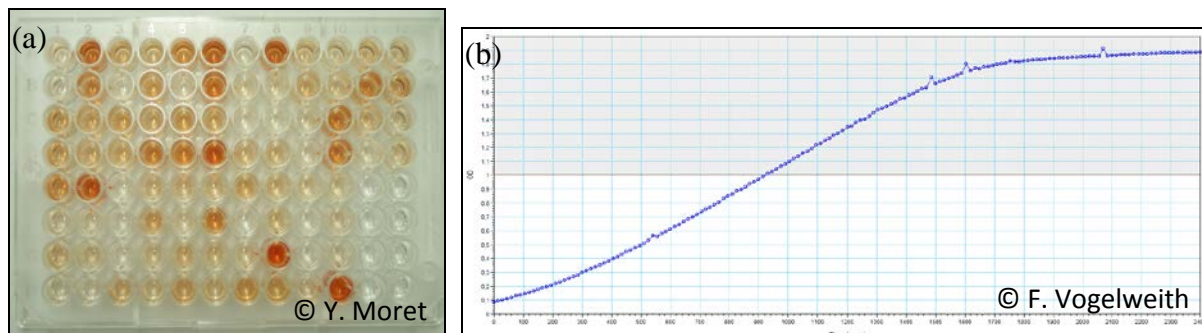


Figure 4. (a) Photographie d'une plaque ELISA après la mesure de l'activité PO (puits pairs) et PPO (puits impairs). Les variations de couleurs sont dues aux différentes concentrations de dopaquinone qui sont corrélées aux concentrations d'enzymes (PO et PPO) dans l'hémolymphe des chenilles testées ; (b) Photographie d'une courbe d'activité PO, catalysant la conversion de L-dopa en dopaquinone, d'un échantillon d'hémolymphe (densité optique en fonction du temps) à partir de laquelle la concentration d'enzymes est estimée.

La mesure de l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe s'effectue à l'aide d'un test d'inhibition de zone. L'activité antimicrobienne de l'hémolymphe est testée contre une inclusion de la bactérie, *Arthrobacter globiformis*, dans une boîte de Petri. Les échantillons d'hémolymphe sont déposés dans des puits réalisés dans l'agarose à l'aide d'une pipette Pasteur équipé d'une poire d'aspiration. Puis les boîtes sont incubées pendant 48 h à 30°C. Pendant ce temps, les substances antimicrobiennes contenues dans l'hémolymphe inhibent la croissance d'*A. globiformis* entraînant la formation d'une zone circulaire transparente, libre de toutes bactéries autour du puits. Le diamètre d'une zone d'inhibition est proportionnel à la concentration des peptides antimicrobiens contenus dans l'hémolymphe (**Figure 5**). La présence ou l'absence de ces zones d'inhibition est ainsi comptabilisée.



Figure 5. Boîte de Petri présentant les tests classiques d'inhibition de croissance bactérienne de l'hémolymphe des différents individus testés (un puits par individu).

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

La concentration d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe des chenilles est influencée par le cépage de vigne (**Figure 6; Tableau 1**). En effet, les larves récoltées sur les cépages Pinot Gris (TK) et Cinsault (PR) ont significativement plus d'hémocytes que celles récoltées sur les cépages Riesling (TK) et Grenache (PR) (TK : Kruskal-Wallis : $\chi^2_2 = 6,45$, $p = 0,04$; PR : Kruskal-Wallis : $\chi^2_1 = 8,09$, $p = 0,004$).

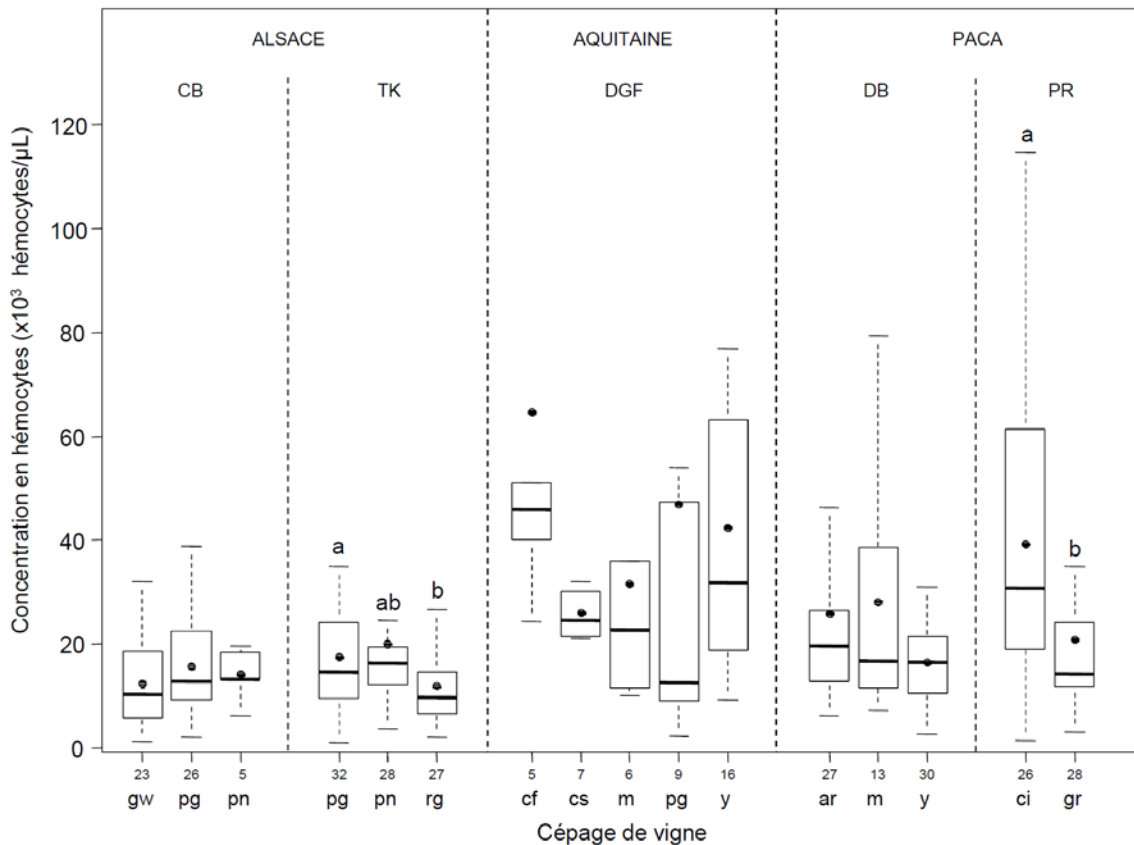


Figure 6. Concentration d'hémocytes ($\times 10^3$ hémocytes/ μL) dans $1\mu\text{L}$ d'hémolymphe en fonction des cépages de vigne sur lesquels les chenilles ont été récoltées. Se référer au matériel et méthodes pour les acronymes des abscisses. Le nombre de chenilles testées est indiqué au dessus des noms des cépages. Les bords des rectangles représentent les premiers et troisièmes quartiles, les traits centraux les médianes ; les moyennes sont représentées par des ronds noirs et les maxima et minima par traits pointillés. Une même lettre présente au dessus des barres d'erreur indique que les groupes ne sont pas significativement différents.

En revanche, les activités enzymatiques de la PO et la PPO ne sont pas influencées par le cépage de vigne (**Figure 7** pour la PPO; **Tableau 1**). En effet, une forte variabilité au sein des différents cépages échantillonnés existe. Ces résultats sont en accord avec ceux d'études précédentes en populations naturelles qui montrent que ces paramètres immunitaires sont très variables *in natura* (Reznick et al., 2000).

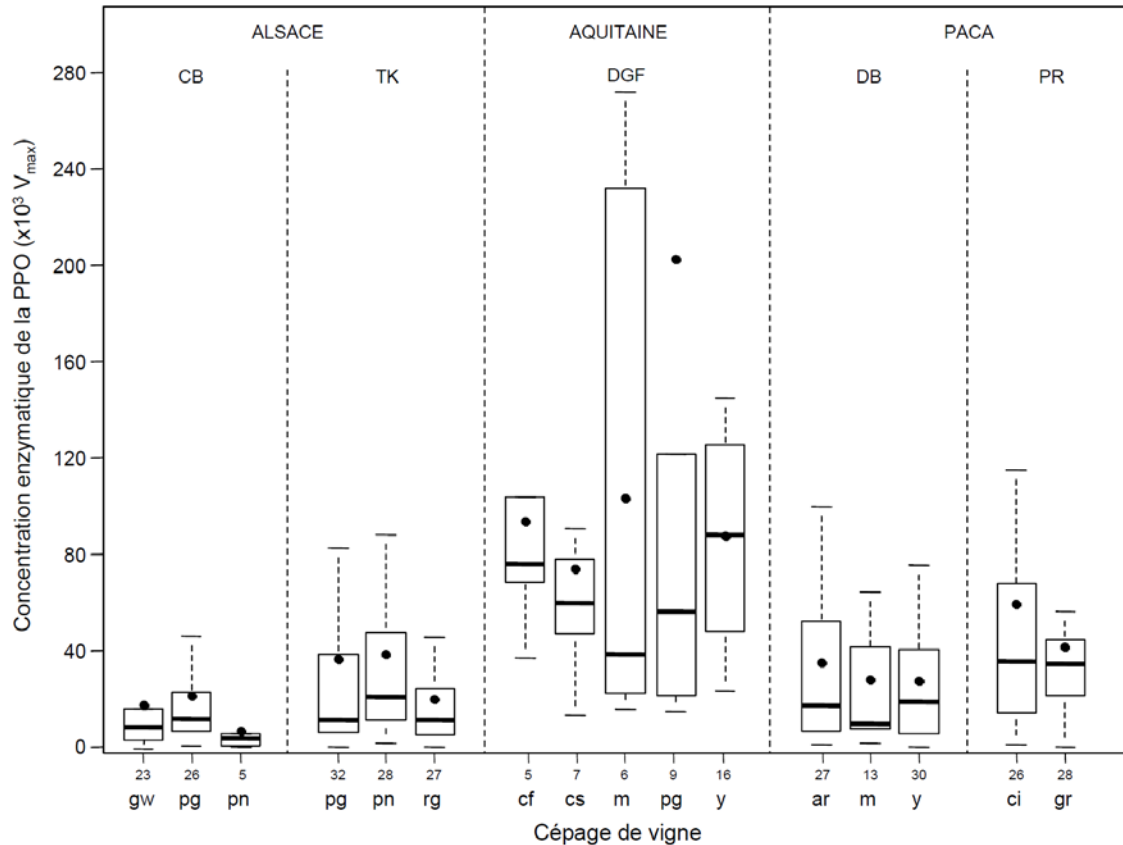


Figure 7. *Activité enzymatique de la PPO ($x 10^3 V_{max}$) dans $1\mu L$ d'hémolymphe en fonction des cépages de vigne sur lesquels les chenilles ont été récoltées ; plus la valeur est forte, plus la concentration en PPO est élevée. Se référer au matériel et méthodes pour les acronymes des abscisses. Le nombre de chenilles testées est indiqué au dessus des noms des cépages. Les bords des rectangles représentent les premiers et troisièmes quartiles, les traits centraux les médianes ; les moyennes sont représentées par des ronds noirs et les maxima et minima par traits pointillés. Une même lettre présente au dessus des barres d'erreur indique que les groupes ne sont pas significativement différents.*

Le pourcentage d'individus présentant une activité antimicrobienne est fortement influencé par le cépage de vigne sur lequel les chenilles ont été récoltées (**Figure 8; Tableau 1**). En effet, dans le domaine de la Grande Ferrade, 100% des chenilles collectées sur les cépages Cabernet Franc et Pinot Gris ont une activité antimicrobienne contre 20% des chenilles collectées sur le cépage Cabernet Franc (χ^2 de Pearson : $\chi^2_4 = 26,05$; $p = 0,001$). De même, dans le domaine de Boisviel, 70% des chenilles récoltées sur le cépage Arinornoa ont une activité antimicrobienne alors que seulement 20% des chenilles issues du cépage Chardonnay en ont une (χ^2 de Pearson : $\chi^2_2 = 11,17$; $p = 0,004$).

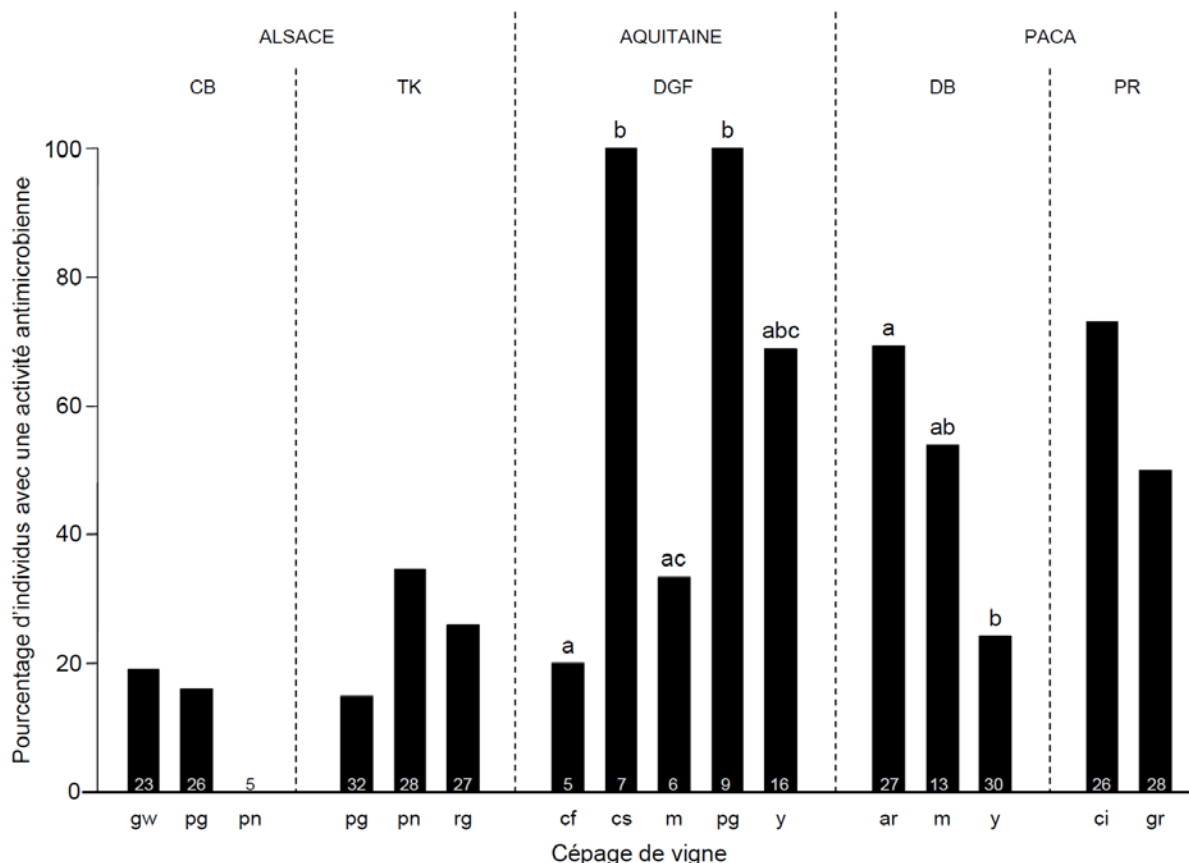


Figure 8. Pourcentage d'individus ayant une activité antimicrobienne dans leur hémolymphe en fonction des cépages de vigne sur lesquels les chenilles ont été récoltées. Se référer au matériel et méthodes pour les acronymes des abscisses. Le nombre de chenilles testées est indiqué en bas des barres noires. Une même lettre présente au dessus des barres indique que les groupes ne sont pas significativement différents.

Tableau 1. Résultats de l'influence du cépage de vigne, dans chaque vignoble, sur la concentration en hémocyte, les activités enzymatiques de la PO et la PPO, et l'activité antimicrobienne dans l'hémolymphe de *L. botrana*. Les valeurs $P \leq 0.05$ sont données en gras. ^a Test de Kruskal-Wallis et ^b Test χ^2 de Pearson. Se référer au matériel et méthodes pour les acronymes.

Vignobles _{df}	Concentration en hémocyte ^a		Activité PO ^a		Activité PPO ^a		Activité antimicrobienne ^b	
	χ	<i>P</i>	χ	<i>P</i>	χ	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
CB ₂	2,40	0,30	3,55	0,17	2,92	0,23	1,11	0,57
TK ₂	6,45	0,04	5,35	0,07	4,00	0,13	2,76	0,25
DGF ₄	7,99	0,43	6,25	0,62	5,63	0,69	26,05	0,001
DB ₂	2,63	0,27	0,31	0,85	0,31	0,85	11,17	0,004
PR ₁	8,09	0,004	0,21	0,64	0,14	0,71	3,021	0,08

CONCLUSION

A l'intérieur d'un vignoble, le cépage de vigne a donc une influence sur les différents paramètres immunitaires des chenilles. Comme les mesures du système immunitaire sont corrélées à la résistance aux parasitoïdes, il est donc fort possible que ce résultat influence le succès de développement d'un parasitoïde à l'intérieur de son hôte, la chenille. Il semble donc important de tenir compte de l'immunité du ravageur dans les programmes de luttes biologiques. En effet, si certains cépages dégradent ou améliorent l'expression de certains effecteurs immunitaires chez le ravageur, l'efficacité des agents biologiques visant à lutter contre ces derniers peut être compromise ou améliorée selon les cas. Par conséquent, le choix des agents biologiques de contrôle des ravageurs de la vigne dépendra du cépage de vigne considéré pour une efficacité de lutte maximale.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons tous nos remerciements à Alexandre Bauer, Aude Balourdet, Olivier Bonnard (Inra), Lionel Delbac (Inra), Morgane Dourneau, Philippe Kuntzmann, Karine Monceau (Inra), Didier Richy et Alexandra Vincent-Boudrot. Ce travail est réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'Inra de Bordeaux et l'Université de Bourgogne (Dijon).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barnay O (1999) Dynamique des populations et relation hôte-parasitoïde chez le couple *Lobesia botrana* Den. and Schiff. – *Trichogramma cacoeciae* Marchal, dans le cadre de la lutte biologique en vignoble. Thèse de Doctorat, Université de Paris VI, 188 pp.
- Cerenius L, Söderhäll K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev*, **199**, 116-126.
- Fabre-Nys C, Thiéry D (2012) Des odeurs pour les troupeaux ou contre les parasites de culture. Roland Salesse et Rémi Gervais (eds) ; *In : Odorat et goût : de la neurobiologie des sens chimiques aux applications*, chapitre 33, Editions QUAE, Versailles, 419-430.
- Fellowes MDE, Godfray HJC (2000) The evolutionary ecology of resistance to parasitoids by *Drosophila*. *Heredity*, **84**, 1-8.
- Ifoulis AA, Savopoulou-Soultani M (2004) Biological control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae by using different formulations of *Bacillus thuringiensis* in 11 vine cultivars under field conditions. *J Econom Entomol*, **97**, 340-343.
- Hommay G, Gertz C, Kienlen JC, Pizzol J, Chavigny P (2002) Comparison between the control efficacy of *Trichogramma evanescens* Westwood and of two *Trichogramma cacoeciae* Marchal strains against vine moth (*Lobesia botrana* Den. and Schiff.) depending on their release density. *Biocontrol Sci Technol*, **12**, 569-581.
- Moreau J, Richard A, Benrey B, Thiéry D (2009) Host plant cultivar of the grapevine moth *Lobesia botrana* affects the life history traits of an egg parasitoid. *Biological Control*, **50**, 117-122.

Moreau J, Villemant C, Benrey B, Thiéry D (2010) Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae) : the influence of region and cultivar. *Biol Control*, **54**, 300-306.

Nappi AJ, Ottaviani E (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, **22**, 469-480.

Ponton F, Wilson K, Cotter SC, Raubenheimer D, Simpson SJ (2011) Nutritional Immunology: A Multi-Dimensional Approach. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002223. doi:10.1371/journal.ppat.1002223

Reznick D, Nunney L, Tessier A (2000) Big houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction. *Trends Ecol Evol*, **15**, 421-425.

Siva-Jothy MT, Moret Y, Rolff J (2005) Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. *Advances Insect Physiol*, **32**, 1-48.

Siva-Jothy MT, Thompson JJW (2002) Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiol Entomol*, **27**, 206-212.

Strand MR (2008) The insect cellular immune response. *Insect Sci*, **15**, 1-14.

Thiéry D (2008) Les tordeuses nuisibles au vignoble. *In : Les ravageurs de la Vigne*, Férét, Bordeaux, France.

Thiéry D, Delbac L (2011) *Phéromones et confusion sexuelle en vignoble*. Union Viticole des Vins de Bordeaux, 1076, 38-43.

Thiéry D, Delbac L, Villemant C, Moreau J (2011) Control of grape berry moths using parasitoids, should it be developed? *IOBC/WPRS Bulletin*, **67**, 189-196.

Vogelweith F, Thiéry D, Quaglietti B, Moret Y, Moreau J (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. *Functional Ecol*, **25**, 1241-1247.