

J.-M. ELSÉN

INRA, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex

e-mail : Jean-Michel.Elsen@toulouse.inra.fr

7 - Utilisation des marqueurs génétiques

Sélection et introgression assistées par marqueurs

Résumé. La sélection et, plus généralement, l'amélioration génétique assistée par marqueurs est une des perspectives très importantes d'application de la génétique moléculaire. Les principes de base en sont rappelés et les modalités de mise en oeuvre rapidement décrites. L'efficacité de ces méthodes d'amélioration nouvelles est estimée relativement à celle des méthodes traditionnelles basées sur les seules informations quantitatives et généalogiques. Elle est d'autant plus grande que les valeurs génétiques sont difficiles à estimer (héritabilité faible, caractère exprimé dans un seul sexe ...). Le gain maximum sera obtenu en modifiant l'organisation de la sélection (pré-sélection des reproducteurs, introgression génique).

Voici plus de 10 000 ans que les hommes sélectionnent certaines espèces d'animaux pour leur profit. Au vingtième siècle, l'efficacité de cette sélection a été considérablement accrue par la conception de modèles mathématiques de l'hérédité, le développement des méthodes biométriques, l'organisation à très grande échelle du contrôle et de l'enregistrement des performances et l'artificialisation de la reproduction, multipliant les pressions de sélection possibles (inséminations, superovulation). L'utilisation de ces progrès technologiques par les sélectionneurs a permis un accroissement extraordinaire de la productivité des animaux de ferme. Citons par exemple une augmentation de 3,3 points du pourcentage de muscle chez les porcs de race Large White en France de 1977 à 1990 (Ducos et Bidanel 1993), ou une augmentation du potentiel laitier des béliers Lacaune de près de 100 litres entre 1965 et 1995 (Astruc *et al* 1997).

Une deuxième révolution pour l'organisation de la sélection, et son efficacité, nous est annoncée depuis une quinzaine d'années avec l'avènement de la génétique moléculaire. Nous sommes devenus capables de suivre la transmission de segments chromosomiques d'une génération à la suivante, donc de préciser les ressemblances entre apparentés en les analysant par région génomique (à terme gène par gène) et non plus globalement.

Une littérature s'accumule pour évaluer la réalité de cette révolution, et imaginer comment les pratiques de sélection devraient être modifiées pour tirer profit de ces informations nouvelles. Les estimations de supplément de gain génétique par rapport aux méthodes purement biométriques varient incroyablement, de plus de 300 % pour les plus optimistes (Lande et Thompson 1990) à des valeurs négatives pour les pessimistes (Ruane et Colleau 1995). Que faut-il croire ?

1 / Grands principes de l'amélioration génétique

L'amélioration génétique joue sur le choix des populations (lignées, races...) et leurs croisements et sur le choix et les accouplements des reproducteurs intra populations.

La sélection en race pure comprend trois phases imbriquées :

- le contrôle de performances, en ferme ou en station spécialisée, avec un enregistrement des généalogies, qui porte chaque année en France sur des millions de données ;
- l'évaluation de la valeur génétique des candidats à la sélection à l'aide de méthodes statistiques et d'algorithmes de calcul de plus en plus fins et complets ;
- les accouplements entre reproducteurs, avant la sélection quand une phase de testage sur descendance est incluse dans le plan de sélection, après la sélection pour la diffusion du progrès génétique, et entre les meilleurs reproducteurs pour renouveler le cheptel des mâles.

De nombreux travaux théoriques ont été publiés sur l'estimation du gain génétique que procure un plan de sélection selon son organisation et les données de la nature (fertilité des reproducteurs, héritabilité des caractères, etc). Ces travaux se poursuivent encore aujourd'hui, les efforts se concentrant ces dernières années sur la gestion à long terme de la variabilité génétique dans les populations de taille finie et sur la sélection de gènes identifiés (gènes majeurs ou QTL).

Le modèle de base pour l'estimation du progrès génétique s'écrit

$$\Delta g = i(q) \cdot \rho \cdot \sigma / t, \text{ où :}$$

Δg est l'espérance du gain par unité de temps ;

$i(q)$ est « l'intensité de sélection », ou supériorité des retenus par rapport aux candidats en unités d'écart type du critère de sélection. Le paramètre $i(q)$ dépend du taux de sélection q ;

ρ est la précision du critère de sélection, fonction du nombre de mesures, de leur origine (apparemment entre le candidat et les animaux mesurés), et de l'héritabilité du caractère ;

σ est la variabilité (écart type génétique) du caractère sélectionné ;

t est l'intervalle de génération ou âge moyen des parents à la naissance de leurs descendants.

Le gain génétique est d'autant plus important que la sélection est plus intense (q faible), précise (ρ grand), rapide (t faible) et que le caractère est plus variable génétiquement (σ grand).

Les croisements exploitent les effets d'hétérosis, supériorité des descendants croisés par rapport à la demi-somme des moyennes parentales, qui s'expliquent notamment par les effets de dominance, et les effets de complémentarité entre races (accouplement, par exemple, entre une brebis de race à bonne aptitude maternelle et un bélier de race à viande). Les modalités du croisement sont diverses, avec les croisements dits terminaux (avec une ou deux générations de croisements), les croisements répétés (rotatifs, alternatifs), ou la création de lignées synthétiques. L'introgession de l'allèle favorable en un locus connu d'une race donneuse, de faibles aptitudes générales, vers une race receveuse ou commerciale, est un cas particulier de croisement qui ne valorise les différences raciales que pour un seul gène à effet important (des extensions sont maintenant envisagées pour l'introgession simultanée de plusieurs QTL).

Nous examinons dans la suite de cet article les modalités d'utilisation des marqueurs au niveau des deux principales stratégies d'amélioration génétique, sélection et croisement, et les gains potentiels qui en découlent.

2 / La sélection assistée par marqueurs

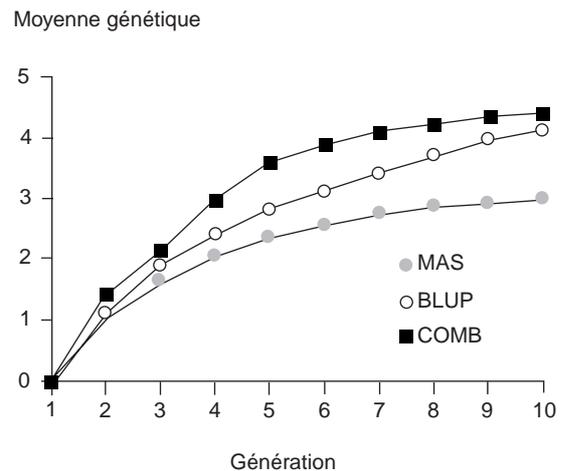
Dans un souci d'analyse, nous pouvons reprendre un par un les termes de l'espérance du gain génétique annuel et montrer pour chacun ce que l'information moléculaire peut apporter. Il doit cependant être clair qu'en pratique la sélection assistée par marqueurs (SAM) doit valoriser simultanément les différentes entrées.

2.1 / Précision de la sélection (ρ)

Les premiers travaux sur le sujet se sont focalisés sur ce point. Améliorer la précision de la sélection à l'aide d'un marqueur suppose que soit établi (par des observations préalables pour détecter les QTL ; Le Roy et Elsen 2000, cet ouvrage) que, dans une population, un allèle M1 en ce locus marqueur est en déséquilibre de liaison avec un allèle Q1 favorable en un QTL proche. S'il en est ainsi, le génotype au locus marqueur ajoute de l'information sur la valeur génétique des candidats, et la sélection dès le plus jeune âge des animaux porteurs de M1 sera

favorable. L'idée peut être généralisée à plusieurs marqueurs simultanément, avec à l'extrême un 'balisage' complet du génome, tous les gènes à effet quantitatifs polymorphes étant marqués, voire connus. De Koning et Weller (1994) ont simulé cette situation extrême dans le cas d'une sélection massale, où les candidats sont triés sur leurs propres performances et sélectionnés sans considération des relations de parenté (figure 1).

Figure 1. Supériorité relative à la sélection massale traditionnelle d'une sélection directe sur tous les QTL ($n=10$) contrôlant un caractère (d'après de Koning et Weller 1994).



Cette comparaison fixe la limite supérieure de l'efficacité de la SAM basée sur la seule amélioration de la précision de l'évaluation des reproducteurs. Le gain est considérable à très court terme pour un caractère de faible héritabilité. Il diminue au fil des générations et devient relativement modeste (au regard des efforts de génotypage nécessaires) à long terme pour une héritabilité classique de 0,20. Ce résultat est général.

De nombreux facteurs diminuent l'efficacité de ce type de SAM : le nombre de QTL détectés, l'importance et la pérennité du déséquilibre de liaison, la précision de l'estimation des effets.

Chez les plantes, il est possible de trouver, et si nécessaire de créer par croisement, un déséquilibre de liaison entre marqueurs et QTL à l'échelle d'une population. Lande et Thompson (1990) ont évalué l'efficacité relative de la SAM dans ce cas, pour différentes modalités de sélection. Les gains estimés sont considérables, d'autant plus que l'héritabilité du caractère est faible et que la part de la variance expliquée par les QTL marqués est importante. Leur article, qui reprenait beaucoup d'un travail ancien de Smith (1967), a fait une publicité très positive à la SAM. Les résultats étaient basés sur le progrès génétique attendu après une seule génération de sélection. Plusieurs articles ont réévalué à la baisse les progrès possibles en considérant la diminution progressive du déséquilibre de liaison au cours des générations de sélection, due aux recombinaisons génétiques (Zhang et Smith 1992, Gimelfarb et Lande 1994), et en prenant en compte les incertitudes sur l'estimation des effets des QTL (Zhang et Smith 1993).

Chez les animaux, il n'y a pas, généralement, de déséquilibre de liaison fort à l'échelle des populations et la SAM doit valoriser les déséquilibres de

liaison intra-famille, qui existent toujours : dans la descendance d'un père double hétérozygote M1Q1/M2Q2, avec une liaison génétique θ entre les locus marqueur et quantitatif, les individus ayant reçu M1 ont une supériorité $\Delta=(1-2\theta)\alpha$ sur ceux ayant reçu M2, α étant l'effet de substitution de l'allèle Q1. Cette association se transmet dans les générations suivantes, en se diluant progressivement. Fernando et Grossman (1989) ont, les premiers, montré comment la prendre en compte dans les méthodes d'indexation des reproducteurs. L'idée sous-jacente est que les relations entre apparentés sont précisées au niveau de locus marqués (le coefficient de parenté en ce locus entre deux demi-frères ayant reçu le même allèle du père est, par exemple, supérieur à ce coefficient entre deux demi-frères ayant reçu des allèles différents). L'application de cette évaluation génétique assistée par marqueurs n'est pas rentable quand le caractère faisant l'objet de la sélection est facile à mesurer, chez les mâles comme chez les femelles. Ainsi, Ruane et Colleau (1995) ont chiffré entre -0,3 et +1,3 % selon l'héritabilité (0,5 et 0,1) le gain dû à cette technique par rapport aux méthodes classiques à la 6ème génération d'application d'un schéma de sélection 'bovin laitier' du type MOET (Multiple Ovulation & Embryo Transfer) avec 64 mères. D'une façon générale, il faut avoir à l'esprit que les méthodes traditionnelles sont très précises, la corrélation entre la valeur génétique d'un mâle testé sur descendance et son estimation étant très proche de 1. A contrario, l'apport des marqueurs pour augmenter la précision ρ sera importante si les caractères sont peu héritables ou difficiles à mesurer : Ruane et Colleau (1996) appliquant le même schéma de sélection à un caractère exprimé uniquement par les femelles trouvent un gain de 1,5 et 6 %, pouvant passer à 4,1 et 14,4 % si l'allèle favorable est rare en début de sélection.

La situation extrême est bien entendu celle de caractères qui ne peuvent pas faire l'objet de mesures routinières, mais pour lesquels il serait envisageable d'alterner des phases de détection de QTL (une génération) et d'exploitation en sélection des associations trouvées (plusieurs générations), à l'image du protocole suggéré par Lande et Thompson (1990) pour exploiter le déséquilibre de liaison global. La résistance aux maladies et le comportement maternel ou vis-à-vis de l'Homme, qui peuvent demander des tests en conditions très contrôlées, sont des exemples d'application de ce principe.

2.2 / Intensité de sélection ($i(q)$)

Si la précision des indices de sélection classiques est déjà très élevée, des marges de progrès considérables sont théoriquement possibles pour les taux de sélection. Chez les bovins notamment, seuls quelques mâles sont nécessaires au renouvellement, par insémination artificielle, de grandes populations. En fait, le facteur limitant est toujours le nombre de candidats à comparer : mesurer les performances coûte cher, et seule une petite partie des reproducteurs potentiels nés sont mis en comparaison. L'exemple le plus étudié pour le moment est celui de la présélection des mâles, sur les informations données par les marqueurs, avant leur mise en testage sur descendance. Les gains prédits par rapport aux schémas classiques peuvent atteindre 25% (Kashi *et al* 1990, Meuwissen et van Arendonk 1992). Cette procédure est surtout envisagée pour

une présélection intrafamille, donc entre des animaux non différenciables au vu de leur origine : une sélection au hasard ($q=1$) est remplacée par une sélection avec information. Deux arguments très en faveur de cette présélection sont l'absence de danger que présenterait une estimation incorrecte des effets du QTL (au pire, la sélection est au hasard par rapport aux valeurs génétiques pour le caractère à améliorer) et la quasi absence d'effet sur la variabilité génétique de ce surcroît de sélection, puisque la sélection se fait intra-famille.

Plus généralement, et en simplifiant énormément, imaginons un caractère gouverné additivement par n QTL indépendants polymorphes avec la même fréquence q de l'allèle le plus favorable en chacun de ces QTL. Si un très grand nombre (N) de candidats étaient testés, il devrait être possible de trouver un individu homozygote favorable aux n locus et donc d'atteindre la limite de sélection en une seule génération. La probabilité de cet événement est $\beta=1 - (1-q^{2n})^N$. Pour $\beta=0,9$ et $n=10$ QTL bialléliques avec $q=0,5$, il faudrait tester $N=2\ 414\ 622$ candidats ! Les marges de progrès sont donc considérables.

2.3 / Intervalle entre générations (t)

Réduire l'intervalle entre générations grâce à l'utilisation de données des marqueurs suppose qu'on modifie fortement l'organisation du plan de sélection. Il s'agit en effet de mettre à la reproduction des animaux jeunes, connus uniquement sur les performances de leur ascendance et leur propre « score moléculaire », rassemblés dans un indice de sélection optimisé. Cette mise à la reproduction des jeunes peut être exclusive (seuls les jeunes sont utilisés, comme dans les schémas MOET bovins), ou simplement renforcée par rapport aux schémas de testage sur descendance classique. Chez les ovins laitiers par exemple, il faudrait imaginer de supprimer le testage sur descendance des béliers, de les sélectionner très jeunes sur l'indice de sélection décrit ci-dessus, et de n'utiliser chez les éleveurs sélectionneurs que des mâles de moins de 3 ans. L'utilité de ces possibilités n'a pas été quantifiée ; elle pourrait reposer sur les modèles développés, par exemple, par Ruane et Colleau (1995).

Une approche beaucoup plus ambitieuse, et lointaine, a été proposée par Georges et Massey (1991) sous le nom de « velogenetics ». Il s'agit de combiner la SAM et les possibilités offertes par les biotechnologies de la reproduction. Dans ce schéma, l'intervalle de génération est réduit par la récolte d'ovocytes depuis des veaux encore en gestation. Ces ovocytes sont cultivés, maturés et fertilisés *in vitro* avant d'être implantés dans des femelles receveuses. La sélection est opérée sur les veaux *in utero* ou sur quelques cellules prélevées sur les embryons avant implantation. La vélogénétique a été proposée dans le cadre de l'introgession, mais peut être étendue à la sélection intra-race. Plus récemment, Haley et Visscher (1998) ont imaginé la « whizzogenetics », qui consiste à se débarrasser de la partie la plus encombrante de la génétique : l'animal. Les embryons sont cultivés *in vitro*, sélectionnés sur marqueurs, cultivés, une méiose est induite, puis une fertilisation *in vitro*, les embryons produits entrant dans un cycle suivant de sélection. Après plusieurs cycles (très rapides) permettant d'obtenir le génome souhaité, les embryons sont menés à leur terme *in vivo*. Ces fantasmes biotech-

nologiques verront probablement le jour, mais de grands progrès pour maîtriser la reproduction artificielle restent à faire.

2.4 / Variabilité génétique (σ)

La sélection a pour effet positif à court terme d'augmenter la valeur moyenne des populations pour les caractères sélectionnés, mais pour effet négatif à long terme de réduire la variabilité génétique de ces caractères et donc la possibilité de réaliser plus de progrès. Cet antagonisme fait l'objet d'études théoriques depuis longtemps, la disponibilité en marqueurs ouvrant de nouvelles voies pour le gérer (Verrier et Rognon 2000, cet ouvrage).

Un côté très positif de la SAM, déjà évoqué plus haut, est la possibilité de sélectionner intra famille, ce qui permet un meilleur contrôle de l'évolution de la consanguinité. Il est aussi vraisemblable que la présélection de reproducteurs sur des marqueurs de QTL de caractères « secondaires » (résistance aux maladies, comportement, ...) peu ou non corrélés avec les caractères principaux, aura peu d'influence sur l'élévation des apparentements moyens.

3 / Utilisation des marqueurs pour le croisement

C'est essentiellement l'introgression génique qui a fait l'objet d'études. Des applications pour les autres formes de croisement sont toutefois envisagées.

3.1 / Introgression

L'objectif est de transférer l'allèle favorable F d'une race donneuse D vers une race receveuse R. Si les modalités pratiques d'une introgression peuvent être variées, elles se ramènent toujours à un processus en trois phases : croisement simple D x R ; succession de croisements en retour vers la race R, jusqu'à retrouver un animal très proche dans ses phénotypes (standard de race et performances) de la race R ; accouplements entre animaux de cette dernière génération de retour pour produire des homozygotes FF. Les marqueurs du génome sont très utiles pour deux raisons :

- suivre le gène (ou le QTL) à introgresser au cours des croisements successifs pour ne retenir que les individus porteurs de F ;
- accélérer la reconstitution du génome receveur en sélectionnant, parmi les porteurs de l'allèle F, ceux qui sont les plus proches de la race d'accueil.

Le premier point est d'autant plus important que le génotype au locus majeur est difficile à déduire des observations phénotypiques. Dans le cas d'un gène exprimé après la maturité sexuelle, chez les femelles uniquement et avec des erreurs d'assignation de génotypes, cet intérêt est évident (cf. le gène Booroola). Pouvoir travailler sur les génotypes en deux marqueurs flanquants du gène ajoute beaucoup de puissance au dispositif. Soller et Plotkin-Hazan (1977) montrent ainsi qu'après 6 générations

de croisements en retour, 1 % des individus sont encore porteurs de l'allèle F en l'absence de tout contrôle, 48 % si on suit un marqueur à 10 cM, 93 % si on suit deux marqueurs flanquants à 20 cM l'un de l'autre.

La possibilité d'accélérer la reconstitution du génome receveur a été étudiée en détail par Hospital *et al* (1992). L'idée est de trier les animaux porteurs de l'allèle F sur un indice combinant les informations en de nombreux locus marqueurs répartis sur l'ensemble du génome. Cet indice pour un candidat doit être d'autant plus élevé que le candidat porte plus d'allèles marqueurs originaires de la race d'accueil (en pratique un ou deux par locus pendant les croisements en retour). Par le jeu des liaisons génétiques, c'est l'ensemble du génome receveur qui est ainsi préféré. Les simulations réalisées par Hospital *et al* (1992) dans le cas de l'introgression d'un gène majeur montrent que cette sélection sur marqueur permet d'économiser deux générations de croisement en retour. Visscher *et al* (1996) et Hospital et Charcosset (1997) retrouvent le même type de gain dans le cas de l'introgression d'un QTL, dont la localisation est moins précise.

3.2 / Croisements simples

Par leur nature, les effets d'hétérosis sont difficiles à prévoir à partir des données phénotypiques raciales. Ces effets sont généralement d'autant plus importants que les races utilisées sont distantes, ce qui s'explique par une plus forte proportion de QTL à l'état hétérozygote chez leurs descendants croisés. Les distances entre races peuvent être mesurées de diverses façons, et notamment à l'aide des fréquences alléliques en des marqueurs du génome. L'idée a donc été explorée, surtout en génétique végétale, d'une prédiction des effets d'hétérosis à l'aide de marqueurs. Gavora *et al* (1996) ont publié des corrélations très élevées (0,68 à 0,87) entre hétérosis et taux de partage de bandes minisatellites chez des poules White Leghorn. Cette piste semble donc très prometteuse pour les espèces dans lesquelles la pratique du croisement entre lignées est répandue (volaille, lapin, porc).

Conclusion

Après des premières estimations très optimistes de l'efficacité de l'amélioration assistée par marqueurs, tout un ensemble d'études théoriques, reposant sur des modèles mathématiques souvent complexes, a montré les atouts et les limites de cette voie nouvelle. Parmi les points clés, il faut retenir que la génétique moléculaire apportera d'autant plus que l'observation des phénotypes prédit mal la valeur génétique des animaux (faible héritabilité, caractère lié au sexe, mesures nécessitant des protocoles très contrôlés et coûteux, ...), que la SAM ne peut pas se substituer à la sélection traditionnelle mais doit venir la renforcer, qu'il faut imaginer des plans de sélection nouveaux valorisant au mieux les deux types d'information et exploitant les possibilités offertes par l'artificialisation de la reproduction. La rentabilité de ces opérations doit encore être évaluée.

Références

- Astruc J.M., Briois M., Belloc J.P., Cachena J.B., Fregeat G., Horent M.H., Teinturier P., Barillet F., 1997. Bilan des schémas de sélection ovins laitiers en France. *Rencontres Recherches Ruminants*, 4, 183-186.
- de Koning G.J., Weller J.L., 1994. Efficiency of direct selection on quantitative trait loci for a two trait breeding objective. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 669-677.
- Ducos A., Bidanel J.P., 1993. Utilisation d'un modèle animal multi-caractères pour estimer l'évolution génétique des six caractères de croissance, carcasse et qualité de la viande entre 1977 et 1990, dans les races porcines Large White et Landrace Français. *Journées de la Recherche Porcine en France*, 25, 59-64.
- Fernando R.L., Grossman M., 1989. Marker assisted selection using best linear unbiased prediction. *Genetics Selection Evolution*, 21, 467-477.
- Gavora J.S., Fairfull R.W., Benked B.F., Cantwell W.J., Chambers J.R., 1996. Prediction of heterosis from DNA fingerprints in chickens. *Genetics*, 144, 777-784.
- Georges M., Massey J.M., 1991. Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenology*, 35, 151-159.
- Gimelfarb A., Lande R., 1994. Simulation of marker assisted selection in hybrid populations. *Genetical Research*, 63, 39-47.
- Haley C.S., Visscher P.M., 1998. Strategies to utilize marker-quantitative trait loci associations. *Journal of Dairy Science*, 81, suppl. 2, 85-97.
- Hospital F., Chevalet C., Mulsant P., 1992. Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics*, 132, 1199-1210.
- Hospital F., Charcosset A., 1997. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*, 147, 1469-1485.
- Kashi Y., Hallerman E., Soller M., 1990. Marker-assisted selection of candidate bulls for progeny testing programmes. *Animal Production*, 51, 63-74.
- Lande R., Thompson R., 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124, 743-76.
- Le Roy P., Elsen J.M., 2000. Principes de l'utilisation des marqueurs génétiques pour la détection des gènes influençant les caractères quantitatifs. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 211-215.
- Meuwissen T.H.E., van Arendonk J.A.M., 1992. Potential improvements in rate of genetic gain from marker-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *Journal of Dairy Science*, 75, 1651-1659.
- Ruane J., Colleau J.J., 1995. Marker assisted selection for genetic improvement of animal populations when a single QTL is marked. *Genetical Research*, 66, 78-83.
- Ruane J., Colleau J.J., 1996. Marker-assisted selection for a sex-limited character in a nucleus breeding population. *Journal of Dairy Science*, 79, 1666-1678.
- Smith C., 1967. Improvement of metric traits through specific genetic loci. *Animal Production*, 9, 349-358.
- Soller M., Plotkin-Hazan J., 1977. The use marker alleles for the introgression of linked quantitative alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 51, 133-137.
- Verrier E., Rognon X., 2000. Utilisation des marqueurs pour la gestion de la variabilité génétique des populations. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 253-257.
- Visscher P.M., Haley C.S., Thompson R., 1996. Marker-assisted introgression in backcross breeding programs. *Genetics*, 144, 1923-1932.
- Zhang W., Smith C., 1992. Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. *Theoretical and Applied Genetics*, 83, 813-820.
- Zhang W., Smith C., 1993. The use of marker-assisted selection with linkage disequilibrium: the effect of several additional factors. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 492-496.