

Zeitschrift: Revue suisse d'apiculture
Herausgeber: Société romande d'apiculture
Band: 95 (1998)
Heft: 6

Buchbesprechung: Lu pour vous

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 26.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

L'exoprotéinase de *Bacillus larvae* détruit l'activité antibactérienne *in vitro* des cécropines des insectes lépidoptères et les peptides de la réponse antibactérienne de l'abeille mellifère

Z. Gliński, J. Jarosz, Pologne

Introduction

Les insectes sont exposés continuellement aux microbes et à d'autres agents pathogènes. Bon nombre de ces agents nuisibles sont des composés chimiques ou, plus fréquemment, des produits synthétisés par des organismes vivants parmi lesquels il faut mentionner en premier lieu les bactéries, les virus et les parasites qui provoquent des maladies. Les bactéries pathogènes pour les insectes provoquent les maladies par des mécanismes très différents, mais en règle générale soit elles sécrètent des toxines ou des enzymes histolytiques, soit elles envahissent l'organisme de l'hôte et provoquent de nombreuses destructions au niveau des tissus et des cellules de ce dernier. Le fait qu'un insecte est capable de survivre à une infection, tandis qu'un autre y succombe, dépend de la virulence de l'agent pathogène et des facteurs de résistance de l'insecte.

Les insectes ne disposent que d'une gamme limitée de moyens pour réagir à une variété considérable d'agents pathogènes bactériens. L'abeille est capable de se défendre elle-même contre une large gamme d'agresseurs bactériens grâce à un système immunitaire induit. Au moment où l'abeille entre en contact avec des matières étrangères, elle commence à sécréter dans l'hémolymphe des polypeptides dotés d'activités antibactériennes. Il y a deux classes de protéines immunes antibactériennes: les apidécines (Casteels et coll., 1990 a) et l'abécine (Casteels et coll., 1990 b), qui sont des molécules inductibles bien caractérisées d'un point de vue biochimique.

Certaines espèces de bactéries pathogènes pour les insectes (Siden et coll., 1979), dont *Bacillus larvae* (Jarosz et Gliński, 1990), l'agent causal de la loque américaine, sécrètent au cours du processus infectieux des exoprotéases capables de dégrader les protéines immunes antibactériennes des insectes lépidoptères. La conséquence en est l'affaiblissement de la réponse immune de l'hôte, ce qui permet à l'agent pathogène de se multiplier dans l'hémolymphe et de provoquer finalement la mort de l'hôte. Ces protéinases qui agissent comme des inhibiteurs du type A (InA) de l'immunité (Edlund et coll., 1976), en bloquant de manière sélective l'activité antibactérienne des cécropines (Dalhammar et Steiner, 1984), pourraient offrir une explication partielle de la pathogénie des infections bactériennes des teignes qui attaquent la cire.

Les données exposées dans ce rapport soulèvent la question de savoir si la multiplication de *B. larvae* dans le couvain d'abeilles infecté est facilitée du fait que la protéase qu'il sécrète affecte le système non spécifique de réaction de l'abeille par l'inhibition de l'activité des apidécines, les protéines de la réaction antibactérienne de l'abeille.



Matériel et méthodes

Les écailles de loque américaine (LA)

Les écailles sèches ont été prélevées de colonies d'abeilles (*Apis mellifera* L.) malades de loque américaine, dans le sud-est de la Pologne. On a réuni les prélèvements d'écailles par groupes de quatre colonies (S 1-4, S 5-8 et S 9-12), puis ces échantillons groupés ont été examinés pour la présence de *Bacillus larvae*. A cette fin, une suspension aqueuse d'écailles triturées a été ensemencée sur du milieu solide de Bailey qui a été ensuite incubé à 32° C pendant trois ou quatre jours. Nous n'avons utilisé, pour la préparation, des extraits utilisés dans nos recherches comme inhibiteurs bruts de l'immunité, que les échantillons qui contenaient des spores de *B. larvae*.

Préparation des inhibiteurs bruts de l'immunité

Les échantillons d'inhibiteurs de l'immunité ont été préparés à partir d'écailles de LA et de cadavres de larves de *Galleria mellonella* infectées expérimentalement avec *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti* ou le nématode entomopathogène *Heterorhabditis bacteriophora*. Les écailles provenant de différents ruchers ont été homogénéisées dans de l'eau distillée à l'aide d'un tritrateur en fibres de verre. Les suspensions obtenues (1,5% d'extrait larvaire, en volume/poids) ont été stérilisées à froid à l'aide d'un filtre Schot G-5. Ces échantillons de protéinase brute de *B. larvae* (qui seront désignés dans ce qui suit du terme d'inhibiteur de l'immunité de *B. larvae*) ont été conservés en congélateur jusqu'au moment de l'emploi.

Des larves du stade tardif 7 de *Galleria* ont été inoculées chacune dans l'hémocèle avec 2,5 µl d'une culture de 24 heures de *Ps. aeruginosa* ou de *B. thuringiensis* subsp. *alesti*, deux bactéries pathogènes pour les insectes, dans l'abdomen au niveau de la dernière paire de pattes avec une micro-seringue. Pour ce qui est de *H. bacteriophora*, les larves de fausse teigne ont été exposées en continu à quelque huit cents jeunes nématodes. Chacune des larves qui présentaient les symptômes typiques de l'infection à *Ps. aeruginosa*, *B. thuringiensis* ou *H. bacteriophora*, a été soigneusement triturée, puis suspendue en 10 ml d'eau distillée; ensuite cette suspension a été centrifugée à 10.000 g pour éliminer les restes de tissus et ensuite stérilisée à froid à l'aide d'un filtre G.5. Toutes les larves qui ont servi à la préparation des extraits larvaires bruts ont été prélevées le lendemain de leur mort. L'extrait témoin a été préparé avec des larves saines d'*A. mellifera* ou de *G. mellonella* homogénéisées et traitées de la même manière.

Evaluation de l'activité de la protéinase

L'activité de la protéinase, contenue dans les extraits préparés comme indiqué ci-dessus à partir d'écailles de LA et de larves de *Galleria* et agissant à la manière d'un agent anti-cécropine, a été déterminée par la technique de la diffusion en gélose et exprimée en termes d'activité de la trypsine (EC 3.4.4.4.). Le produit High Power Azure, un substrat général sensible à l'activité protéolytique, a été suspendu dans de la solution tampon de Sørensen à 0,066 M, de pH=7,4. Pour évaluer l'activité des extraits, on a préparé un étalon de trypsine en déposant dans les godets de 2,7 mm de diamètre, creusés dans la couche de gélose, cinq concentrations connues de trypsine, à savoir: 50; 25; 12,5; 6,25

et 3,12 µg/ml. Les autres godets des boîtes contenant de la gélose ont reçu les extraits préparés avec des larves saines d'*A. mellifera* ou de *G. mellonella*.

Evaluation de l'activité antibactérienne des hémolymphes immunes

La production d'apidécines, les substances actives contre les bactéries, a été induite chez des ouvrières encagées par inoculation dans l'hémocèle, entre les segments abdominaux 4 et 5, d'environ 10 000 cellules vivantes d'*E. coli*. Les abeilles ont été gardées à 32° C et l'hémolymphe immune a été prélevée 32 heures après l'inoculation.

Des larves de *G. mellonella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) ou des pupes de *C. euphorbiae* (*Lepidoptera: Sphingidae*) en diapause ont été immunisées avec 150 000 cellules environ d'une culture d'*E. coli* en phase logarithmique, puis laissées pendant vingt heures pour que l'immunité s'installe. Les échantillons d'hémolymphe prélevés sur les insectes immunisés ont été examinés pour déterminer leur activité antibactérienne *in vitro*.

L'activité antibactérienne induite de l'hémolymphe des insectes a été estimée à l'aide du diamètre des zones d'inhibition de la croissance d'*E. coli* autour des godets de 2,7 mm de diamètre, dans lesquels avaient été déposés les hémolymphes immunes. Chaque boîte de Petri (de 10 cm de diamètre) contenait 10 ml de gélose molle (à 0,7% d'agar-agar) à laquelle on avait incorporé environ 100 000 cellules bactériennes d'*E. coli* D31 d'une culture en phase logarithmique, 800 µg de streptomycine sulfate et une quantité infinitésimale de 1-phényl-2-thio-urée (Sigma) pour prévenir la mélanisation de l'hémolymphe des insectes (tout particulièrement de celle d'abeille) due à l'activité de la phényloxydase.

Mise en évidence de l'inhibition des apidécines et de l'activité antibactérienne du type cécropine de l'abeille

Par des essais *in vitro*, on a déterminé l'activité résiduelle des mélanges constitués d'hémolymphe immune et d'un inhibiteur de l'immunité brut, en vue d'évaluer la perte d'activité antibactérienne subie par l'hémolymphe soumise à l'action d'un inhibiteur. A l'exception des cas où il est spécifié autrement, le mélange testé contenait 50% d'hémolymphe immune d'abeille et 25% d'extrait d'écaillés de LA en 100 µl de solution aqueuse. Le mélange a été examiné pour la présence des apidécines après une courte période de contact (dix minutes tout au plus) à 23°C. Le témoin ne contenait que de l'hémolymphe immune d'abeille, sans addition d'inhibiteur de l'immunité.

Résultats

Les apidécines et l'abécine, deux classes de peptides inductibles chez les abeilles, sont les responsables de l'activité antibactérienne de l'hémolymphe immune contre les bactéries à gram négatif. Les apidécines, et tout particulièrement l'apidécine IA, sont de plusieurs fois plus actives envers la souche D31 d'*E. coli* que l'abécine. A l'aide du test *in vitro* réalisé dans le but de mettre en évidence les effets dépresseurs des exoprotéinases sécrétées par différents agents pathogènes pour les insectes sur les peptides de la réponse immune de l'abeille mellifère, on a évalué le niveau d'inhibition de la croissance d'*E. coli* due à l'activité des apidécines et de l'abécine présentes dans l'hémolymphe immune des



abeilles vaccinées. L'activité inhibitrice des protéinases synthétisées par les agents bactériens pathogènes pour les abeilles, *B. larvae* et *B. thuringiensis* subsp. *alesti* et par le nématode *H. bacteriophora*, mentionnées sur le tableau 1 ; semble être dirigée contre l'activité antibactérienne tant des apidécines que de l'abécine. Les inhibiteurs de l'immunité, utilisés en quantité de 25 µl d'extrait brut préparé à partir de larves d'abeilles infectées avec *B. larvae* ou de larves de *G. mellonella* infectées avec *Ps. aeruginosa*, *B. thuringiensis* subsp. *alesti* ou *H. bacteriophora*, ont effectivement bloqué l'activité des peptides de la réponse immune des abeilles.

Dans une autre série d'expériences, nous avons utilisé un polypeptide de la réponse immune purifié, la cécropine B. (Sigma), obtenu de la teigne *Hyalophora cecropia*, dans le but de mettre en évidence les effets supprimeurs des inhibiteurs de l'immunité, y compris de l'exoprotéinase de *B. larvae*, sur les protéines immunes inductibles des insectes. Comme on peut le voir sur le tableau 2, la protéinase de *B. larvae* détruit complètement l'activité antibactérienne de la cécropine B, tandis que l'inhibiteur de l'immunité produit par *B. thuringiensis* semble être beaucoup moins efficace. La forte action de l'inhibiteur sécrétée par *B. larvae* a été très nettement mise en évidence à l'aide du système test utilisé, contenant 7,0 µg de cécropine B pure, capable de produire une zone claire de lyse de la culture d'*E. coli* de 10,5 mm de diamètre autour du godet.

Sur le tableau 3, nous présentons l'activité inhibitrice des extraits préparés à partir de larves d'abeilles infectées de LA, provenant de différentes colonies de ruchers isolés géographiquement les uns des autres (les distances les séparant étaient de plus de 25 km). L'activité antibactérienne contre *E. coli* D31 des échantillons d'hémolymphe provenant de pupes de *G. mellonella* et de *C. euphorbiae* vaccinées dépend dans une très grande mesure de l'existence des molécules du type attacine et cécropine, les principales protéines immunes antibactériennes pouvant être induites chez les lépidoptères (Boman et Hultmark, 1987). Tous les extraits d'écaillés de LA ont bloqué dans une mesure plus ou moins grande l'activité antibactérienne des cécropines des teignes de la cire. Néanmoins, cette activité inhibitrice varie comme intensité d'un échantillon de protéinase extracellulaire de *B. larvae* à l'autre. Généralement, l'effet dépresseur des extraits bruts de larves loqueuses sur la croissance d'*E. coli* coïncide avec l'activité protéolytique de l'échantillon exprimée en termes d'activité de la trypsine (EC 4.3.3.3). Les échantillons S 5-8 qui avaient une faible activité protéolytique exerçaient des effets inhibiteurs à peine décelables sur les cécropines provenant tant de *Galleria* que de *Celerio* (tableau 3). Il est intéressant de

Tableau 1 : Inhibition de l'activité antibactérienne des peptides immuns de l'hémolymphe par des inhibiteurs de l'immunité du type A (InA)

Origine de l'inhibiteur de l'immunité	Activité des peptides immuns de l'abeille*
<i>Bacillus larvae</i> (1,5%)	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>alesti</i>	0
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	0
Témoins**	7,5

* Le diamètre en mm de la zone de lyse de la culture d'*E. coli* D31.

** Solution aqueuse à 50% d'hémolymphe immune d'Apis.

Tableau 2 : Inhibition in vitro de l'activité antibactérienne de la cécropine B de synthèse (Sigma) par les protéinases extracellulaires de *Bacillus larvae* et de *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*.

Inhibiteur de l'immunité	Activité antibactérienne de la cécropine B de synthèse*
<i>Bacillus larvae</i>	0
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>alesti</i>	traces
Témoins**	10,5

Le mélange test était constitué de 7,0 μg de cécropine B d'*Hyalophora cecropia* dans 20 μl d'eau, de 10 μl d'inhibiteur de l'immunité brut et d'eau distillée jusqu'à 100 μl , dans un tube d'Eppendorf.

* Le diamètre en mm de la zone de lyse de la culture d'*E. coli* D31.

** Solution de cécropine B sans addition d'inhibiteur de l'immunité.

Tableau 3 : L'action inhibitrice de la protéinase extracellulaire des extraits de larves d'abeilles loqueuses sur les cécropines de *Galleria mellonella* et de *Celerio euphorbiae*.

Echantillon testé	Activité protéolytique* de l'extrait (en $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Activité antibactérienne des cécropines** de	
		<i>Galleria</i>	<i>Celerio</i>
S 1-4	11	traces	4,5
S 5-8	7,5	5,0	5,5
S 9-12	14	traces	traces
S 0,75 %	18,5	0	0
Larves saines d'abeilles	traces	7,5	8,0

* Exprimée en termes d'activité de la trypsine (EC 3.4.4.4)

** Le diamètre en mm de la zone de lyse de la culture d'*E. coli* D31.

signaler que l'un des extraits de larves d'abeilles loqueuses, à la concentration de 0,75% (S 0,75%), a complètement bloqué – dans cette expérience – l'activité antibactérienne des cécropines provenant tant de *Galleria* que de *Celerio*. Par ailleurs, c'est justement de l'activité inhibitrice de cet extrait que s'occupe le rapport de Jarosz et Gliński paru en 1990.

Discussion

Pendant une longue période de temps, les recherches portant sur la réponse immune chez les insectes ont été limitées principalement aux teignes de la cire et aux mouches (Dunn, 1986; Boman et Hultmark, 1987; Lambert et coll., 1989; Matsuyama et Natori, 1990). C'est à peine ces dernières années que Casteels et coll. (1990) a, b) ont isolé de l'organisme des abeilles deux groupes de pep-

tides riches en proline et dotés d'activité antibactérienne. D'un point de vue fonctionnel, les apidécines et l'abécine des abeilles peuvent être considérées comme étant analogues aux cécropines des teignes et aux diptéricines des mouches. Par la mise en liberté d'un inhibiteur de l'immunité du type A, les agents bactériens pathogènes pour les insectes sont capables d'annihiler l'activité antibactérienne de l'hémolymphe et en premier lieu celle des cécropines envers *E. coli* et envers d'autres bactéries à gram négatif. L'inhibiteur de l'immunité sécrétée par *B. thuringiensis* est une protéase qui dégrade par voie enzymatique deux des classes de protéines antibactériennes: les cécropines et les attacines (Dalhammar et Steiner, 1984). Il est intéressant de signaler le fait qu'une protéase extracellulaire sécrétée par *B. larvae* au cours du processus infectieux dans l'organisme des larves d'abeilles détruit de manière spécifique l'activité antibactérienne de la cécropine de l'hémolymphe des teignes de la cire (Jarosz et Gliński, 1990). Ce faisant, cette exoprotéinase est proche d'un point de vue fonctionnel d'un inhibiteur du type A produit par *B. thuringiensis*. Les peptides de la réponse immune de l'abeille sont sensibles à l'action inhibitrice d'une protéinase de *B. larvae*, comme à celle des protéinases du type A sécrétées par *B. thuringiensis* (Siden et coll., 1979), *H. bacteriophora* (Jarosz et coll., 1994) et *Ps. Aeruginosa* (tableau 1). Ceci étant donné, l'affirmation semble raisonnable selon laquelle l'exoprotéinase de *B. larvae* contribue à donner à cette bactérie pathogène pour les abeilles son caractère de tueur d'insectes. La capacité des protéinases mises en liberté par les agents pathogènes pour les insectes d'inhiber l'activité antibactérienne des cécropines et des attacines des teignes de la cire, ainsi que celle des apidécines et de l'abécine et probablement aussi d'autres peptides de la réaction antibactérienne d'autres insectes, est due aussi au fait que toutes ces protéines induites ont des molécules à structure ouverte, ce qui les rend accessibles à la digestion protéolytique. Dans ces conditions, il n'est pas du tout surprenant de constater que l'activité antibactérienne de la cécropine B de synthèse (Sigma) d'*Hyalophora cecropia* est détruite par la protéinase de *B. thuringiensis* et par l'exoprotéinase de *B. larvae* (tableau 2).

L'une des caractéristiques les plus constantes de *B. larvae* est le fait qu'il produit des enzymes protéolytiques stables au cours du processus de sporulation. La forme des apidécines active envers les bactéries est présente dans l'organisme des abeilles adultes, mais dans l'organisme des larves d'abeilles on trouve une pro-apidécine biologiquement inactive (Casteels et coll., 1990 a), ce qui fait que le rôle de cette protéinase extracellulaire dans la pathogénie de la loque américaine demeure encore obscur. Actuellement, nous savons de manière certaine que la protéase de *B. thuringiensis* interfère avec la réponse immune humorale chez les lépidoptères. Par ce mécanisme, un inhibiteur rend possible la multiplication des bactéries dans l'hémocèle. Cependant, il semble logique d'admettre que la protéinase de *B. larvae* n'est pas impliquée dans la pathogénie de la loque américaine, compte tenu du fait que cet enzyme protéolytique est mis en liberté durant le processus de sporulation de l'agent pathogène, que sur le couvain d'abeilles les apidécines existent sous une forme inactive et que *B. larvae* est un parasite obligé du couvain d'*A. mellifera* mais n'attaque pas les abeilles adultes.

On pourrait supposer que les exoprotéinases sont capables d'intervenir dans la pathogénie des septicémies bactériennes des abeilles par un mécanisme d'interférence avec les facteurs de défense antibactérienne de l'hémolymphe des abeilles.

Pour établir si *Hafnia alvei*, *Pseudomonas apisepticus* et *Bacillus pulvifaciens* sécrètent elles aussi dans l'organisme de l'abeille infectée des protéinases extracellulaires qui détruisent de manière sélective l'activité des apidécines et de l'abécine et permettent ainsi aux bactéries de se multiplier à l'intérieur de la cavité corporelle de l'abeille, des recherches supplémentaires sont nécessaires, portant sur l'activité des inhibiteurs du type A de l'immunité dans l'organisme des larves infectées. La capacité d'inhiber l'activité antibactérienne des protéines de la réponse immune semble être donc bien réelle, compte tenu du fait que la plupart des bactéries pathogènes pour les insectes, sinon toutes, mettent en liberté au cours du processus infectieux des protéinases extracellulaires du type A.

Conclusion

Bacillus larvae, l'agent causal de la loque américaine (LA), sécrète au cours du processus infectieux, dans l'organisme de l'abeille, une protéinase extracellulaire dotée de la propriété d'inhiber l'immunité par l'annulation de l'activité des protéines immunes inductibles de l'abeille. Les apidécines et l'abécine exposées à l'action de la protéinase de *B. larvae* perdent en totalité leur activité antibactérienne envers *E. coli*. Tout comme d'autres inhibiteurs de l'immunité mis en liberté par certaines bactéries pathogènes pour les insectes, la protéinase de *B. larvae* détruit de manière spécifique l'activité antibactérienne des cécropines produites par *Galleria mellonella* et par *Celerio euphorbiae*, ainsi que celle de la cécropine B de synthèse (Sigma) d'*Hyalophora cecropia*. Les écailles de larves loqueuses provenant de ruchers différents se distinguent entre elles de manière significative du point de vue de l'activité protéolytique de l'extrait, qui coïncide avec la capacité de celui-ci d'inhiber l'activité antibactérienne de la cécropine des hémolymphes prélevées sur des insectes immunisés. Les essais préliminaires d'identification ont montré qu'il existe des ressemblances entre l'exoprotéinase de *B. larvae* et un inhibiteur de l'immunité du type A (InA) produit par *Bacillus thuringiensis*.

Bibliographie

- Boman, H. ; D. Hultmark (1987) – Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 103-126.
- Casteels, P. ; C. Ampe ; F. Jacobs ; M. Vaeck ; P. Tempst (1990 a) – Apidaecins : antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8, 2387-2391.
- Casteels, P. ; C. Ampe ; J. Rivière ; J. Van Damme ; C. Elicone ; M. Flemming ; F. Jacobs ; P. Tempst (1990 b) – Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybees (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 187, 381-386.
- Dalhammar, G. ; H. Steiner (1984) – Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem* 139 : 247-252.
- Dunn, P. E. (1986) – Biochemical aspects of insect immunology. *Ann Rev. Entomol.* 31: 321-339.
- Edlund, T. ; I. Siden ; H. G. Boman (1976) – Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of *Saturniid pupae*. *Infect. Immun.* 14, 934-941.
- Jarosz, J. ; Z. Gliński (1990) – Selective inhibition of cecropin-like activity of insect immune blood by protease from American foulbrood scales. *J. Invert. Pathol.* 56, 143-149.

Tiré de *Apicata*, N° 1, 1998

