

Effets du Bilan Alimentaire en Cations et en Anions sur les performances zootechniques des vaches laitières selon les teneurs en énergie rapidement dégradable et en protéines des rations.

E. APPER-BOSSARD (1), J. L. PEYRAUD (1), F. MESCHY (2), P. FAVERDIN (1)

(1) INRA Unité Mixte de Recherche sur la Production du Lait, 35590 Saint-Gilles

(2) UMR INRA / INA-PG Physiologie de la Nutrition et Alimentation, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris cedex 05

RESUME - En élevage bovin laitier, les pratiques actuelles conduisent souvent à l'apparition d'états de sub-acidose, responsables de pertes économiques. Pour sécuriser les rations, l'utilisation de Bilan Alimentaire en Cations et en Anions (BACA) élevés représente une piste intéressante, puisque l'absorption des cations se fait contre des ions H^+ à l'inverse de celle des anions qui se fait contre les bicarbonates. Deux essais ont été conduits pour tester cette hypothèse et définir plus précisément les seuils à recommander en faisant l'hypothèse que les réponses pouvaient être modulées selon la teneur en énergie rapidement dégradable du rumen (risque d'acidose ruminale) et les teneurs en PDIE des rations, les protéines pouvant avoir un rôle tampon. Les lois de réponse de l'ingestion, de la production du lait et des paramètres de l'équilibre acido-basique du sang à des niveaux croissants de BACA, ont été décrites d'une part dans l'essai 1 pour des rations comportant 4 % de blé vs 22 % de blé et orge et comportant 90 g PDIE / UFL (48 vaches) et d'autre part dans l'essai 2 pour des rations comportant 90 g PDIE / UFL vs 115 g PDIE / UFL (24 vaches) et contenant 22 % de céréales. Les essais ont été conduits en *split-plot*, les vaches étant réparties en 2 groupes selon le niveau d'énergie dégradable ou de protéines de la ration. Dans l'essai 1, elles ont reçu 3 niveaux de BACA (0, 150 et 300 mEq / kg MS) selon un dispositif en carré latin 3x3 et dans l'essai 2 elles ont reçu 2 niveaux de BACA (0 et 300 mEq / kg MS) selon un dispositif en inversion. Les périodes ont été de 4 semaines. Dans l'essai 1, la MS ingérée et le taux butyreux du lait ont augmenté linéairement avec le BACA mais seulement pour la ration la plus riche en énergie rapidement dégradable. Dans l'essai 2, la MS ingérée a augmenté avec le BACA pour la ration la moins riche en PDIE mais a diminué avec la ration à 16 % de MAT. Le volume de lait produit n'a pas été affecté. Le pH, les bicarbonates et les réserves alcalines du sang ont augmenté avec les BACA pour tous les rations et avec la teneur en protéines du ration (essai 2). Ces résultats montrent que l'accroissement du BACA permet de lever un frein à l'ingestion et de sécuriser les rations riches en énergie rapidement dégradable surtout lorsque l'apport en PDIE est maintenu au plus juste, et cela probablement en maintenant l'homéostasie du pH sanguin. Les rations présentant un excès de PDIE ne semblent en revanche pas nécessiter d'apport élevé de BACA.

Effect of Dietary Cation-Anion Balance on intake, milk yield and acid-base status in lactating dairy cows fed diets differing by the level of rapidly degraded starch and protein.

E. APPER-BOSSARD (1), J. L. PEYRAUD (1), F. MESCHY (2), P. FAVERDIN (1)

(1) UMR INRA / AGROCAMPUS sur la Production du Lait, 35590 Saint-Gilles

SUMMARY - In dairy cows, current feeding practices often lead to the appearance of states of sub-acidosis, which lead to economic losses. To make diets safer, the use of high Dietary Cation-Anion Difference (DCAD) represents a possible solution, since the absorption of cations occurs in competition with H^+ ions, while the opposite is true for anions which are absorbed in competition with bicarbonates. Two trials were carried out to test this theory and to define more precisely the DCAD that could be recommended for dairy cows. We also studied whether the level of highly degradable energy in the rumen (risk of ruminal acidosis) and dietary PDIE (proteins having a buffering effect) could modify the recommendations. The response to increasing levels of DCAD on ingestion, milk production and the parameters of blood acid-base balance were described in trial 1 for diets containing 4 % wheat vs. 22 % wheat / barley and 90 g PDIE / UFL (48 cows) and in trial 2 for diets containing 90 g PDIE / UFL vs. 115 g PDIE / UFL (24 cows) and 22 % cereal. The trials were carried out according to a Split-plot design: the cows were divided into 2 groups according to the highly degradable energy or the protein level of the diet. In trial 1, the cows received 3 levels of DCAD (0, 150 and 300 mEq / kg DM) in a 3x3 Latin square design, while in trial 2 they received 2 levels of DCAD (0 and 300 mEq / kg DM) in a cross-over design. The measurement periods lasted 4 weeks. In trial 1, DM intake and the milk fat content increased linearly with BACA but only for the diet with the highest level of highly degradable energy. In trial 2, the DM intake increased with DCAD for the diet with the lowest level of PDIE but decreased with the diet containing 16 % CP. The milk yield was not affected. Blood pH, bicarbonates and alkaline reserves increased with DCAD for all diets and with dietary protein content (trial 2). These results show that an increase in DCAD improves on feed intake and makes diets that are rich in highly degradable energy safer, especially when the PDIE content of the diet exactly covers the requirements. This is probably achieved by maintaining blood pH homeostasis. Diets containing high levels of PDIE did not appear to require a high DCAD.

INTRODUCTION

Chez la vache laitière en pleine lactation, l'intensité des phénomènes digestifs et métaboliques entraîne une production importante d'acides tant au niveau ruminal qu'au niveau métabolique. Cette situation favorise l'apparition d'états de sub-acidose latente, à l'origine de pertes de production et d'une sensibilité accrue à d'autres troubles de la santé. Afin de prévenir ce risque, de nombreux travaux ont été effectués mais ils ont souvent été focalisés au niveau ruminal. Pourtant, l'absorption des cations (Na^+ , K^+) se faisant contre des protons (H^+) et celle des anions (Cl^- , S^{2-}) se faisant contre des bicarbonates (HCO_3^-) qui est le tampon sanguin le plus important, on peut supposer qu'une ration apportant régulièrement un excès de cations doit limiter les risques d'apparition d'état de sub-acidose métabolique. L'équilibre ionique du ration est souvent défini par le Bilan en Cations et Anions ($\text{BACA}_{\text{mEq/Kg MS}} = \text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^- - \text{S}^{2-}$) ou par le Bilan Electrolytique (BE), qui n'intègre pas le soufre.

Deux analyses quantitatives de la bibliographie ont récemment confirmé cette hypothèse en montrant que le pH sanguin, l'ingestion de MS et la production du lait s'accroissaient avec le niveau de BACA (Apper-Bossard et Peyraud, 2004a ; Hu et Murphy, 2004). Cependant ces études ne permettent pas de déceler des réponses différentes selon les situations alimentaires. Pourtant, les réponses pourraient être modulées selon la teneur en amidon rapidement dégradable de la ration qui est un facteur connu pour affecter le pH et la production d'acides dans le rumen (Sauvant *et al.*, 1998) et peut être aussi par la teneur en protéines qui semble posséder une capacité tampon (Rico-Gomez et Faverdin (2001).

L'objectif de ce travail a été 1) de décrire les effets de niveaux croissants de BACA sur les performances zootechniques selon les teneurs en énergie rapidement dégradable et en PDIE des rations et 2) d'étudier les mécanismes impliqués, notamment au niveau de l'équilibre acido-basique du sang.

1. MATERIEL ET METHODES

Dans un premier essai, l'objectif a été de décrire les lois de réponses de l'ingestion et de la production du lait à 3 niveaux croissants de BACA (0, 150 et 300 mEq / Kg MS) pour des rations présentant des risques différents d'acidose ruminale. Ils comportaient pour cela soit 4 % de blé (ration B) soit 22 % d'un mélange de blé et d'orge (ration H). Dans un second essai, l'objectif a été de tester l'effet des 2 niveaux extrêmes de BACA dans le cas de ration peu pourvue en PDIE (BN : 13 % MAT ou 90 g PDIE / UFL) ou plus riche (HN : 16 % MAT, 115 g PDIE / UFL).

Les modalités d'obtention des valeurs de BACA ont été identiques dans les deux essais en modulant les teneurs en chlore et sodium et en maintenant le potassium constant. Un CMV a été formulé pour que la ration ait un BACA de 150 mEq / Kg MS avec un apport de 3 % de CMV. A partir de ce CMV, le niveau 0 a été obtenu par ajout de chlorure d'ammonium, le niveau 300 a été obtenu en remplaçant le phosphate monobasique par du phosphate disodique et par ajout de carbonate de sodium. L'utilisation du bicarbonate de sodium a été évitée afin de ne pas confondre l'effet tampon sur le rumen du bicarbonate avec celui du BACA. Les teneurs en électrolytes autres que le sodium et le chlore ont été constantes.

Dans le premier essai, la ration B comportait 79 % d'ensilage de maïs et 17 % de concentré composé de (sur la base de la MS), 44,2 % de tourteaux de soja tannés, 32,3 % de tourteaux de soja, 21,5 % d'orge et 2,0 % de vinasse. La ration H comportait 59 % d'ensilage et 37 % de concentré composé de 13,5 % de tourteaux de soja tannés, 13,5 % de tourteaux de soja, 20,2 % d'orge, 39,2 % de blé, 8,1 % de luzerne déshydratée et 5,5 % de mélasse. Dans le second essai la ration BN était la même que la ration H. La ration HN a été obtenue par substitution de 10 % de concentré par 10 % de tourteaux de soja tanné. Les teneurs en PDIN ont été ajustées à partir de l'urée et du chlorure d'ammonium en fonction des niveaux de BACA souhaités. Dans les deux essais, les rations ont été distribuées à volonté sous forme de rations complètes. Elles étaient iso-énergétiques et iso-azotées (pour le premier essai).

Quarante-huit et vingt-quatre vaches en pleine lactation ont respectivement été utilisées dans le premier et le second essai. Les animaux étaient à 80 j et 116 j de lactation pour une production de 32 kg en moyenne au démarrage du premier et du second essai respectivement. Les essais ont été conduits avec un schéma en *split-plot*. Les vaches ont été mises en lot en 2 groupes qui ont chacun reçu le même type de ration tout au long de l'essai et les 3 niveaux de BACA selon un carré latin 3 x 3 dans le premier essai et les deux niveaux de BACA selon un schéma en inversion dans le second essai. Dans les 2 essais, les périodes duraient 4 semaines.

L'ingestion et la production du lait ont été mesurées chaque jour. Les taux ont été mesurés au cours de 6 traites successives chaque semaine. Pour la caractérisation de l'équilibre acido-basique, les prises de sang ont été effectuées au niveau coccygien avant repas sur chaque vache une fois par période en dernière semaine. Dans le premier essai, les acides gras du lait ont été déterminés à partir d'un échantillon individuel regroupant les 2 traites d'une journée. Dans le second essai des prélèvements d'urine ont été effectués le mardi de la dernière semaine pour le suivi des fuites en électrolytes.

2. RESULTATS

Les niveaux de BACA ont été conformes aux valeurs attendues. Les niveaux de BE ont évolué dans le même sens mais ont été plus élevés puisqu'ils n'intègrent pas le soufre. Dans le premier essai, l'ingestion totale n'a globalement pas été accrue par la proportion d'énergie rapidement dégradable. Elle a augmenté avec l'accroissement du niveau de BACA mais uniquement pour le ration H. Finalement l'ingestion de la ration H a été presque identique à celle de la ration B pour les BACA très faibles et a été 1,8 kg MS / j plus élevée pour les BACA de 300 mEq / kg MS. Dans le second essai l'accroissement du niveau de BACA a augmenté l'ingestion de 0,9 kg MS / j pour le ration BN mais l'a diminué de 0,7 kg / j pour le ration HN. L'augmentation du niveau protéique a accru l'ingestion de 1,6 kg MS / j pour les BACA faibles et n'a pas eu d'effet pour les BACA élevées.

La production du lait, les taux protéiques et le poids vif n'ont jamais été affectés par les traitements. Dans le premier essai, le taux butyreux a été fortement réduit (- 6,0 g / kg) par l'accroissement du niveau de concentré et il s'est accru avec le niveau de BACA mais uniquement avec la ration H. Finalement, l'écart entre les 2 rations qui était de 7,7 g / kg

pour les BACA faibles n'a plus été que de 3,9 g / kg pour le BACA de 300. Les acides gras impairs du lait ont fortement augmenté avec le niveau de concentré ainsi que les poly-insaturés. Le niveau de BACA n'a pas affecté la proportion en acides gras insaturés. Il a légèrement réduit les teneurs en acides gras impairs mais uniquement dans le cas de la ration H.

Dans les deux essais, l'accroissement des BACA a accru

linéairement et fortement le pH, les teneurs en bicarbonates et les réserves alcalines (SBE) du sang. Dans le premier essai ces effets ont été plus marqués avec le ration H que le ration B. Le niveau de concentré n'a en revanche pas eu d'effet sur ces paramètres. Dans le second essai l'accroissement du niveau de protéines a augmenté le pH (+0,03 unités) sanguin et les réserves alcalines (+1,0 mmole / L), ces effets étant additifs avec ceux des BACA.

Tableau 1 : effet de l'accroissement du BACA sur les performances zootechniques, les acides gras du lait et l'équilibre acido-basique du sang des vaches en pleine lactation nourries avec des rations plus ou moins riches en énergie rapidement dégradable.

Concentré BACA	Bas			Haut			ETR	ETR conc.	Con ¹	BACA ²	Conc* BACA ³
	Bas	Moyen	Haut	Bas	Moyen	Haut					
BACA (mEq / kg MS)	17	169	327	4	156	306	-	-	-	-	-
BE (mEq / kg MS)	87	238	390	86	231	380	-	-	-	-	-
MSI, kg / j	22,2	22,1	22,2	22,8	23,7	24,0	0,99	4,54	NS	L**	L**
PL, kg / j	28,3	28,5	28,8	29,2	29,3	29,3	1,36	7,17	NS	NS	NS
TB, g / kg	41,8	41,9	41,9	34,1	35,5	38,0	2,17	9,91	**	L***	L***
TP, g / kg	32,2	31,8	31,8	33,5	33,5	33,6	7,01	4,05	NS	NS	NS
Poids Vif, kg	630	628	641	646	640	655	10,8	105,0	NS	NS	NS
AGL ⁴ impairs (%)	3,14	3,46	3,42	6,95	6,63	4,47	1,191	1,319	**	L†	L*
AG monoinsaturés (%)	22,1	21,8	23,2	25,0	27,5	25,7	2,00	5,69	NS	NS	NS
AG polyinsaturés (%)	2,5	2,6	2,6	2,9	3,2	2,8	0,25	0,60	†	NS	NS
pH sang	7,49	7,50	7,50	7,49	7,49	7,53	0,036	0,043	NS	L**	NS
HCO ₃ ⁻ (mEq / L)	29,9	30,8	31,4	29,1	31,2	32,1	1,87	3,12	NS	L***	L†
Excès de base (mmol/L)	6,09	7,02	7,55	5,39	7,23	8,42	1,850	3,044	NS	L***	L†
Na ⁺ sang (mEq / L)	136	137	136	136	136	136	1,9	1,9	NS	NS	NS
K ⁺ sang (mEq / L)	4,26	4,34	4,16	6,12	4,27	4,45	3,465	3,214	NS	NS	NS
Cl ⁻ sang (mEq / L)	93,6	92,7	91,8	94,4	92,9	91,6	2,0	2,7	NS	L***	NS

¹ Conc. = effet de l'apport en énergie rapidement dégradable ; ² BACA = effet de l'accroissement du BACA ;

³ Conc*BACA = effet de l'interaction ⁴ AGL = Acides gras du lait. Les concentrations sont exprimées en % molaire.

L = effet linéaire, † = P < 0,10 ; * = P < 0,05 ; ** = P < 0,01 ; *** = P < 0,001

Tableau 2 : effet de l'accroissement du BACA sur les performances zootechniques, l'équilibre acido-basique du sang et sur le pH et les concentrations en sodium et en chlore de l'urine des vaches en pleine lactation nourries avec des rations plus ou moins riches en protéines et riches en énergie rapidement dégradable.

Niveau protéique BACA	Bas		Haut		ETR	ETR N	N	BACA	N x BACA
	Bas	Haut	Bas	Haut					
MSI, kg / j	20,7	21,6	22,3	21,6	1,29	3,42	NS	NS	*
PL, kg / j	30,2	29,1	30,5	30,3	1,51	6,20	NS	NS	NS
TB, g / kg	31,9	33,0	36,7	38,5	3,58	10,40	†	NS	NS
TP, g / kg	31,1	31,9	31,9	32,0	1,06	3,47	NS	NS	NS
Poids Vif, kg	649	655	645	646	7,2	85,3	NS	NS	NS
pH sang	7,41	7,44	7,44	7,47	0,030	0,060	†	**	NS
HCO ₃ ⁻ (mEq / L)	27,8	29,5	28,3	30,5	1,71	1,77	NS	**	NS
Excès de base (mmol/L)	3,73	5,52	4,46	6,79	1,695	1,84	†	***	NS
Na ⁺ sang (mEq / L)	136	136	135	135	1,3	2,1	NS	NS	NS
K ⁺ sang (mEq / L)	4,48	4,36	4,28	4,13	0,865	0,264	*	*	NS
Cl ⁻ sang (mEq / L)	97,2	95,0	94,8	93,3	1,9	2,2	**	**	NS
pH urine	6,8	8,3	7,1	8,4	0,53	0,78	NS	***	NS
Na ⁺ urine (mEq / L)	89	132	62	129	36	42	NS	***	NS
K ⁺ urine (mEq / L)	132	105	138	123	0,7	27,1	NS	**	NS
Cl ⁻ urine (mEq / L)	277	151	241	136	52,5	61,1	NS	***	NS

¹ Prot. = effet de l'apport en protéines ; ² BACA = effet de l'accroissement du BACA ; ³ Prot*BACA = effet de l'interaction

L = effet linéaire, † = P < 0,10 ; * = P < 0,05 ; ** = P < 0,01 ; *** = P < 0,001

La teneur plasmatique en sodium n'a jamais été affectée par les traitements, elle a toujours été très proche de 136 mEq / L. En revanche la chlorémie a été très variable. Elle a très fortement diminuée avec l'accroissement des BACA dans les 2 essais. Dans le premier essai, les effets ont été de même amplitude quelle que soit la teneur en énergie rapidement dégradable de la ration. Dans le second essai, l'accroissement de la teneur en PDIE a également diminué la chlorémie, les effets étant additifs avec ceux du niveau de BACA. La teneur plasmatique

en potassium n'a pas été affecté par les traitements dans le premier essai. Elle a diminué significativement avec le niveau de protéines et le niveau de BACA dans le second essai, mais les différences sont restées assez faibles.

L'accroissement du niveau de BACA a entraîné un accroissement du pH urinaire et des concentrations en sodium de l'urine et une diminution des concentrations en potassium et en chlore. Les PDIE n'ont pas eu d'effet sur ces paramètres de la composition de l'urine.

3. DISCUSSION

Les résultats montrent que l'ingestion s'accroît globalement avec le niveau de BACA, ce qui confirme les synthèses bibliographiques récente (Hu et Murphy, 2004 ; Apper-Bossard et Peyraud, 2004a). Toutefois, nos résultats montrent que ces effets sont modulés par la composition de la ration. En particulier, ils sont d'autant plus marqués que les rations sont plus riches en énergie rapidement dégradable confirmant ainsi notre hypothèse de départ. Dans le premier essai, l'ingestion totale ne s'est pas accrue avec le niveau d'énergie rapidement dégradable pour le faible niveau de BACA et l'effet de l'énergie rapidement dégradable sur l'ingestion n'est devenu sensible que pour des niveaux de BACA supérieurs à 150 mEq / kg MS. Ils ont alors été du même ordre de grandeur (1,7 kg MS / j) que ce qui est prévu par le système UE (+ 1,4 kg MS / j). L'effet du niveau de BACA sur l'ingestion est aussi modulé par la teneur en PDIE des rations. L'accroissement des BACA stimule l'ingestion dans le cas des rations pauvres en PDIE et n'a plus d'effet, voire un effet inverse lorsque le ration est bien pourvue en PDIE. Avec des vaches pâturant une herbe à 215 g MAT, Roche *et al.* (2003) avaient également rapporté une tendance à la baisse de l'ingestion avec l'accroissement des BACA.

L'accroissement du niveau de BACA affecte directement l'équilibre acido-basique de l'animal. Dans tous les cas, les composantes de cet équilibre ont été améliorées avec l'accroissement des BACA en accord avec les données de la littérature (Hu et Murphy, 2004 ; Apper-Bossard et Peyraud, 2004a). Il est notable de remarquer que dans le premier essai, le pH du sang et les réserves alcalines ont été plus élevés avec la ration H et les BACA élevés qu'avec la ration B avec les BACA faibles malgré la différence d'ingestion d'énergie rapidement dégradable (0,8 vs 5,4 kg / j du mélange blé-orge). Ce résultat montre que les BACA permettent de sécuriser ces rations riches en énergie rapidement dégradable.

L'accroissement de la teneur en PDIE affecte aussi l'équilibre acido-basique du sang en accroissant le pH et l'excès de base. Ce résultat montre que les PDIE ont bien un effet de tampon au niveau métabolique. Ce rôle des PDIE avait déjà été suggéré par Rico-Gomez et Favardin (2001) qui avaient montré dans une analyse quantitative de la bibliographie que l'effet positif des apports de PDIE sur l'ingestion était plus marqué pour les rations ne contenant pas de substances tampons. Cet effet tampon des PDIE peut expliquer leur effet positif sur l'ingestion tel qu'il a été observé dans notre essai avec les niveaux faibles de BACA. Il est en revanche possible que l'excès de tampons sanguins apporté simultanément par les PDIE et les BACA élevés ait entraîné un début d'alcalose limitant alors l'effet des PDIE sur l'ingestion.

L'accroissement du taux butyreux et la chute des acides gras impairs en réponse à l'accroissement des BACA avec le ration H peut laisser supposer que les BACA ont également un effet au niveau de la digestion ruminale. Toutefois, les teneurs en acides gras insaturés et notamment en acides trans (résultats non présentés) n'ont pas varié, ce qui laisse supposer que les phénomènes d'hydrogénation auraient été peu affectés. De plus, Apper-Bossard et Peyraud (2004b) ont montré avec les mêmes rations que les BACA n'affectaient pas les profils fermentaires du rumen.

L'équilibre acido-basique du sang est lui-même finement régulé par l'excrétion urinaire de protons et de chlore. Pour les rations à BACA très faible, le pH urinaire diminue ce qui traduit une excrétion plus importante de protons pour limiter la chute du pH sanguin. L'excrétion de chlore dans l'urine s'accroît aussi, ce qui correspond à un mécanisme de réabsorption des bicarbonates contre le chlore au niveau des néphrons. Finalement, le pH urinaire varie avec le BACA, ce qui a été observé dans d'autres essais (Hu et Murphy, 2004 ; Apper-Bossard et Peyraud, 2004a et b). En outre, le pH urinaire ne semble ni dépendre de la teneur en PDIE de la ration et est peu affecté par la teneur en énergie rapidement dégradable (Apper-Bossard et Peyraud, 2004 b). Il pourrait être un indicateur du niveau de BE de la ration, dont la détermination est coûteuse et difficile.

CONCLUSION

Les résultats confirment le rôle important de l'équilibre acido-basique de l'animal dans la régulation de l'ingestion. L'accroissement du niveau de BACA permet de sécuriser des rations riches en énergie rapidement dégradable surtout lorsque les apports PDIE sont limités. Les rations présentant un excès de PDIE ne semblent en revanche pas nécessiter d'apport élevé de BACA. Des études complémentaires seraient nécessaires pour mieux préciser les zones à risques et les recommandations d'apports en énergie rapidement dégradable, en PDIE et en BACA. Dans l'état actuel des connaissances, on peut retenir une valeur de 150 à 200 mEq / kg MS pour des rations de vaches à haut niveau de production.

Les auteurs tiennent à remercier INZO groupe IN VIVO pour leur soutien technique et financier.

Apper-Bossard E., Peyraud J.L., 2004a. Renc. Rech. Rum., ce numéro

Apper-Bossard E., Peyraud J.L., 2004b. J. Anim. Feed Sci., 13 (suppl 1), sous presse

Hu W., Murphy M.R., 2004. J. Dair Sci., 87, 2222-2229

Rico-Gomez M., Favardin P., 2001. Renc Rech Rum, 8, 285-288.

Sauvant D., Meschy F., Mertens D., 1998. Prod Anim., 12, 49-60.