

LA MAÎTRISE DE LA COUVAISON EN ÉLEVAGE PAR DES PROCÉDÉS PHARMACOLOGIQUES ; VERS DE NOUVELLES PERSPECTIVES

Guémené D.¹, Crisóstomo-Pinto Sônia¹⁻², Kunhlein U.³, Garreau-Mills Maryse¹, Zadworny, D.³

¹ Station de Recherches Avicoles, I.N.R.A. Centre de Tours, 37380 Nouzilly, France.

² Faculdade de Veterinária, U.E.C.E. Depto. de Med. Vet., 60715 Fortaleza, Ceará, Brasil.

³ Department of Animal Science, McGill University, Montréal, Canada, H9X-3V9.

Résumé

Au sein de la filière avicole, la maîtrise de l'expression du comportement de couvaison repose actuellement sur l'usage de techniques d'élevage et de manipulations manuelles complémentaires très contraignantes. L'intérêt potentiel de procédés pharmacologiques prophylactiques ou curatifs est donc indéniable. Ce type d'approche a d'ailleurs fait l'objet d'un grand nombre d'études et un certain nombre de traitements induisent d'ailleurs l'interruption de la couvaison, par contre l'obtention d'un retour en ponte rapide est beaucoup plus aléatoire. L'équipe du Dr. El Halawani (El Halawani *et al.*, 1993) a toutefois récemment indiqué qu'une immunisation dirigée contre le VIP prévient l'expression de la couvaison chez la dinde et qu'elle accroît indirectement le nombre d'œufs pondus. Pourtant, en utilisant la même approche, nous n'avons observé aucun effet inhibiteur de ce traitement vis à vis de l'expression de la couvaison (Guémené, Morvan et Garreau-Mills, données non publiées) et l'équipe du Dr. Sharp (Sharp *et al.*, 1993) a montré que ce traitement prévient l'entrée en ponte chez la poule. Ces résultats contradictoires soulignent par conséquent la nécessité de réaliser des essais complémentaires. Parallèlement nous avons mis au point deux traitements¹ qui, par immunisations active ou passive contre la prolactine, sont efficaces pour prévenir la couvaison chez la dinde (Guémené *et al.*, 1994a,b). Leur efficacité va maintenant être testée chez d'autres espèces d'oiseaux et les procédés développés pour une utilisation à l'échelle industrielle.

Introduction

La couvaison ou incubation correspond à la période durant laquelle un environnement favorable au développement embryonnaire est maintenu autour de l'œuf. Il s'agit par conséquent de l'une des phases majeures du cycle de reproduction naturel des oiseaux, indispensable à la survie des espèces sauvages. Chez les espèces domestiques, les reproductrices ont également longtemps été sélectionnées en fonction de leur capacité à exprimer ce comportement mais depuis que la totalité des œufs à couvrir est incubée artificiellement, l'aptitude à la couvaison, loin d'être considérée comme une qualité est au contraire un facteur défavorable. Son expression subsiste encore chez plusieurs espèces dont les poules de souches lourdes (reproductrices chairs), mais aussi les poules de souches pontes (reproductrices œufs de consommation) lorsqu'elles sont élevées au sol, la cane, l'oie et est surtout très fréquente chez la dinde.

Bien que les conséquences économiques soient importantes, il n'est pas aisé d'évaluer les pertes engendrées tant par la diminution du nombre d'œufs incubables, que par le coût associé à la mise en place de traitements préventifs et curatifs. En admettant que l'usage des traitements limite la perte à un seul œuf par dinde mise en place, le manque à gagner qui en résulte représenterait plus de 4,5 millions de francs par an en France. Manque à gagner, auquel il faut adjoindre un surcoût important en frais de main d'œuvre. On évalue, en effet, que l'éleveur consacre plus de 50% de son temps de travail à agir en vue de prévenir et traiter la couvaison.

Les avantages potentiels de la prévention de son expression par des traitements pharmacologiques ont depuis longtemps suscité l'intérêt des chercheurs et forts nombreuses sont les molécules qui ont été testées dans cette optique. L'efficacité de certaines d'entre elles pour interrompre la couvaison est d'ailleurs indéniable par contre l'obtention d'un retour en ponte rapide est plus aléatoire. L'utilisation de techniques de dosages plus sensibles permet de clarifier progressivement les mécanismes sous-jacents et d'envisager de nouvelles approches. Parallèlement, grâce au développement récent des nouveaux outils de la biologie moléculaire, il est envisageable de faire exprimer le gène d'une protéine d'intérêt dans un micro-organisme ou encore d'en effectuer la synthèse et

¹ Ces traitements ont fait l'objet d'une procédure de dépôt de brevet ; Demande de brevet n°: 94/05550.

d'utiliser ces protéines à des fins pharmacologiques. Ces approches les plus récentes seront donc évoquées ci-dessous après que nous ayons brièvement rapporté les connaissances actuelles relatives aux mécanismes endocriniens impliqués dans le contrôle du cycle de reproduction, en particulier de la couvaison, et la chronologie des différentes approches pharmacologiques qui ont pu être testées à ce jour.

I - Description de l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire

L'hypothalamus, l'hypophyse et l'ovaire constituent l'axe majeur impliqué dans la régulation de la reproduction. L'hypothalamus, une petite structure du cerveau, est le site de synthèse et de sécrétion des "Releasing Hormones" (R.H.). Ces molécules sont libérées dans un sinus veineux et atteignent l'hypophyse. Cette glande est elle-même située à la base de l'hypothalamus et se subdivise en deux sous-unités, la neurohypophyse et l'adenohypophyse. L'adenohypophyse est, entre autres, le site de synthèse et de sécrétion de la LH (Luteinizing Hormone) et de la prolactine (PRL). La LH-RH, c'est à dire la Luteinizing Hormone-Releasing Hormone qui stimule la sécrétion de LH, et le VIP (Peptide vasoactif intestinal), qui joue sans doute un rôle essentiel dans le contrôle des taux circulants de la prolactine en stimulant sa sécrétion, proviennent de l'hypothalamus. L'hypothalamus et l'adenohypophyse sont par conséquent indispensables au développement et au maintien de l'activité gonadique.

La LH, ou Luteinizing Hormone, stimule le développement de l'ovaire et de l'oviducte durant la période d'acquisition de la maturité sexuelle et leur fonction durant la période de reproduction. La LH stimule aussi le développement folliculaire, la sécrétion des hormones stéroïdiennes et joue un rôle essentiel dans le déclenchement de l'ovulation. La PRL ou prolactine, outre son éventuel rôle vis à vis de l'expression de la couvaison que nous évoquerons ci-après, exerce vraisemblablement des effets inhibiteurs au niveau de l'ovaire (Opel et Proudman, 1980 ; Zadworny *et al.*, 1989).

Les hormones stéroïdiennes et en particulier l'œstradiol, la testostérone et la progestérone qui sont synthétisées au niveau de l'ovaire et libérées sous le contrôle des hormones hypothalamo-hypophysaires vont parallèlement réguler la libération des "RH" et des hormones hypophysaires en exerçant des rétrocontrôles négatifs ou positifs. Selon leur concentration, les stéroïdes stimulent ou inhibent la sécrétion hypothalamique de LH-RH et par conséquent la libération de LH. La principale hormone œstrogénique, l'œstradiol-17 β , est synthétisée en partie au niveau des cellules de la thèque interne des follicules en cours de maturation rapide et surtout au niveau des petits follicules de la grappe ovarienne. Elle stimule le développement de l'oviducte et participe au contrôle des diverses étapes de la formation de l'oeuf. Elle est de plus, en synergie avec les androgènes, à l'origine de l'apparition des caractères sexuels secondaires. La progestérone est elle essentiellement synthétisée par les cellules de la granulosa du plus gros follicule de la hiérarchie (F1). C'est par le biais de la progestérone que s'effectue le rétrocontrôle positif sur la sécrétion de LH-RH par l'hypothalamus. Elle joue donc un rôle primordial dans le déclenchement des ovulations.

II - Caractéristiques endocriniennes de la couvaison

L'hypothèse d'un contrôle humoral de l'expression de la couvaison a été émise dès 1927 par Lienhart, en montrant que l'injection de serum provenant d'une poule couveuse pouvait induire ce comportement chez une poule pondeuse. Une élévation des concentrations plasmatiques de prolactine étant associée à l'expression de ce comportement, cette hormone fut ensuite désignée comme en étant le facteur causal (Riddle *et al.*, 1935), ce qui n'a en fait jamais été formellement établi. Les études récentes, employant les techniques de dosages radioimmunologiques et de quantification des ARNm, ont confirmé que des variations, des taux d'expression des gènes spécifiques et des concentrations de plusieurs peptides et/ou hormones au sein de l'axe hypothalamus - hypophyse - ovaire sont associées à l'expression de la couvaison.

Les concentrations plasmatiques de LH et des stéroïdes ovariens, œstradiol (E2) et progestérone (P4), sont plus faibles, alors que le taux plasmatique de prolactine est quant à lui plus élevé durant la période de couvaison que durant celle de ponte (Pour revue : Guémené, 1988). Quoi qu'il en soit, on ne sait toujours pas si l'hyperprolactinémie est cause ou conséquence de la couvaison à moins qu'elle ne soit associée à la décroissance de la consommation d'aliment alors observée, et si les effets antigonadiques observés sont la conséquence directe de la couvaison, de l'hyperprolactinémie et/ou le résultat simultané d'un autre mécanisme ?

Un certain nombre de facteurs du milieu tel que le mode d'élevage, la température et la lumière sont connus pour jouer un rôle déterminant dans l'émergence de ce comportement et l'implication d'une ou plusieurs monoamine(s) (dopamine, sérotonine) et de peptides hypothalamiques (VIP, TRH), dans la chaîne des mécanismes conduisant à l'intégration centrale de ces stimuli exogènes est suggérée (Proudman et Opel, 1983 ; Hall *et al.*,

1986). La sérotonine stimule la sécrétion de la prolactine *in vivo* (Hargis et Burke, 1984) mais il est vraisemblable que son effet soit indirect via la libération d'une R.H. au niveau hypothalamique. Plusieurs études suggèrent que l'une des R. H. pourrait être le VIP puisque ce peptide induit tant *in vivo* (Proudman et Opel, 1983, Talbot *et al.*, 1991) qu'*in vitro* (Opel et Proudman, 1984) l'augmentation du taux de prolactine et de son ARNm au niveau hypophysaire. Une augmentation du taux de VIP au niveau de l'hypothalamus a également été observée durant la période de couvaion (Mauro *et al.*, 1992). Parallèlement le VIP exerce également des effets variables, tantôt inhibiteurs et tantôt stimulateurs, vis à vis de la sécrétion de la LH (Macnamee *et al.*, 1986 ; Sharp *et al.*, 1989, 1993 ; Pitts *et al.*, 1994). Les stéroïdes ovariens favorisent également l'expression de la couvaion en stimulant la sécrétion de prolactine lors du passage de l'état de pondeuse à celui de couveuse (El Halawani *et al.*, 1986).

III - Les traitements pharmacologiques.

Quelqu'en soient la nature, il faut se souvenir que l'objet des traitements anticouvaion est bien l'obtention de performances de ponte maximales. Un traitement anticouvaion doit donc d'une part prévenir et/ou induire l'interruption de la couvaion en association avec un maintien de l'activité reproductrice et/ou d'un retour en ponte rapide selon qu'il s'agisse d'une méthode préventive ou curative. La connaissance progressive des mécanismes endocriniens sous-jacent à l'expression de ce comportement a conduit les scientifiques à élaborer divers types d'approches pharmacologiques que nous allons chronologiquement évoquer ci-après.

3-1 Traitements avec des molécules ayant une activité stéroïdogénique.

Les premiers essais de traitements pharmacologiques consistant en l'administration de stéroïdes ou d'analogues agonistes avaient pour objet de compenser la décroissance des taux circulants de stéroïdes associée à la couvaion. Ce type de traitement induit le plus souvent une interruption de la couvaion, mais tend également à retarder le retour en ponte en raison du rétro-contrôle négatif qu'exercent les stéroïdes sur la sécrétion de LH. A l'opposé, il a été rapporté qu'une molécule antiœstrogénique, le citrate de clomiphène, est active pour interrompre la couvaion et stimuler le retour en ponte (Robinson *et al.*, 1984). Des résultats contradictoires concernant l'efficacité de cette substance ont toutefois été rapportés depuis par plusieurs auteurs (Sharp et Sterling, 1986 ; Renner *et al.*, 1987 ; Guémené et Etches, 1989a). Les résultats de cette dernière étude indiquent d'ailleurs une décroissance des taux de LH après traitement, évolution qui est incompatible avec un retour en ponte rapide. Ce type de traitement n'offre donc aucun avantage pratique.

3-2 Traitements qui stimulent la sécrétion de LH ou compensent sa décroissance.

L'hypophyse d'une dinde couveuse est apte à libérer de la LH en réponse à une stimulation au LHRH (El Halawani *et al.*, 1987 ; Guémené et Williams, 1989, 1992). L'injection répétée de LHRH peut toutefois induire une désensibilisation de l'hypophyse et ne permet pas de restimuler l'activité ovarienne du moins chez la poule naine (Sharp *et al.*, 1986). A l'opposé l'injection de gonadotrophines seriques de jument gravide (PMSG) stimule l'activité ovarienne chez la dinde couveuse mais n'induit ni l'interruption de la couvaion ni le retour en ponte (Zadworny, 1985).

3-3 Traitements inhibant, stimulant ou limitant les effets des monoamines vis à vis de la sécrétion de la prolactine.

Des effets inhibiteurs ou stimulateurs des monoamines, sérotonine et dopamine, sur la sécrétion de prolactine ont été mis en évidence chez les oiseaux (Pour revue : Hall *et al.*, 1986) et l'utilisation de molécules qui interfèrent dans leur processus de synthèse, libération et/ou mode d'action, pour contrôler la couvaion, a fait l'objet de diverses expériences.

En premier lieu, la bromocriptine, un analogue de la dopamine, connu pour inhiber la sécrétion de la prolactine chez les mammifères (Thorner *et al.*, 1981) et qui, chez la poule, favorise l'expression de la couvaion (Robinson *et al.*, 1984). Inversement, le pimozide, qui bloque les récepteurs dopaminergiques, est lui efficace pour interrompre la couvaion et stimuler le retour en ponte chez la dinde (Millam *et al.*, 1980). La dinde doit toutefois être pour cela traitée durant la phase intermédiaire ponte-couvaion, ce qui implique un repérage précoce laborieux en élevage intensif.

La sérotonine stimule la sécrétion de prolactine (Hargis et Burke, 1984 ; Hall *et al.*, 1986) et le parachlorophénylalanine (PCPA), un inhibiteur de sa synthèse, induit éventuellement l'interruption de la couvaion (El Halawani *et al.*, 1983, Guémené et Etches, 1989b). Les résultats positifs, concernant une restauration de l'activité ovarienne, rapportés dans la première étude n'ont par contre pas été confirmés.

3-4 Les nouvelles approches : Serums et Vaccins

Les techniques de vaccination sont largement utilisées pour contrôler ou prévenir l'apparition de maladies mais peuvent également être utilisées pour réguler des concentrations hormonales. Les procédés mis en œuvre diffèrent alors sensiblement. En effet, lorsque qu'il s'agit de vaccins dirigés vers des agents pathogènes, une bactérie, un virus ou leur toxine seront généralement très immunogénique. A l'opposé une hormone ne sera normalement pas ou peu immunogène pour l'espèce considérée. En conséquence, une hormone en tant que telle ne pourra pas être utilisée à titre d'antigène dans un vaccin. En outre, une protection vis à vis d'un agent pathogène perdue même avec un titre en anticorps faible, alors qu'à l'opposé le titre d'un anticorps dirigé contre une hormone doit resté élevé pour inactiver l'hormone endogène et prévenir son activité biologique. L'hormone endogène doit donc être modifiée pour devenir antigénique et induire la production d'anticorps spécifiques. Il est également possible d'injecter des serums (immunisation passive) renfermant des anticorps qui peuvent être produit selon le procédés précédent chez l'espèce hôte, il s'agit alors d'anticorps homologues, ou d'anticorps produit chez une espèce différente et nous sommes en présence d'anticorps hétérologues. L'injection de serums résulte en une neutralisation immédiate de l'hormone contre laquelle est dirigée l'anticorps et par conséquent permet d'influencer très ponctuellement les variations des taux hormonaux. Cette approche nécessite toutefois normalement des quantités importantes de réactifs et il sera donc éventuellement plus difficile de traiter de grand effectif.

Les essais relatifs à ce type d'approche visent à inhiber la sécrétion de la prolactine ou à neutraliser son activité biologique. Les premiers traitements, de type curatifs, ont consisté à administrer des anticorps dirigés contre la prolactine (Lea *et al.*, 1981) et contre le VIP (Sharp *et al.*, 1989) chez des poules naines couveuses. Le premier essai a été interrompu trop prématurément pour préjuger de son efficacité pour interrompre la couvaison et à fortiori vis à vis de la ponte. Par contre, l'injection quotidienne d'anticorps anti-VIP induit une décroissance de la concentration plasmatique de prolactine, l'interruption de la couvaison et un retour en ponte. L'efficacité de ce traitement n'a toutefois jamais été établie chez la dinde et surtout nécessiterait pour être appliqué le repérage préalable des couveuses et leur isolement pendant plusieurs jours, c'est à dire le même type d'interventions que pour les traitements manuels actuellement utilisé par les éleveurs ; obligation qui limite sensiblement l'intérêt de cette approche. Nous avons par contre montré (Guémené *et al.*, 1994a,b) que ce type d'approche était également utilisable avec succès à titre préventif. Ainsi, une immunisation passive par injection d'anticorps dirigés contre la prolactine durant une période limitée du cycle de production après le pic de ponte prévient durablement l'expression de la couvaison.

Parallèlement, les résultats de plusieurs tests préventifs, par immunisations actives dirigées contre le VIP (Sharp *et al.*, 1993, El Halawani *et al.*, 1993, Guémené, Morvan et Garreau-Mills, données non publiées) et contre la prolactine elle même (Guémené *et al.*, 1994a,b), ont été récemment rapportés. Une vaccination contre le VIP consistant en 5 injections à 4 semaines d'intervalles après photostimulation a induit une décroissance des taux de prolactine circulants, limité l'expression de la couvaison à 5% des dindes traitées versus 53% et en conséquence accrue la production d'œufs (El Halawani *et al.*, 1993). Parallèlement, en utilisant une approche similaire, Sharp *et al.* (1993), ont rapporté que ce traitement limite certes la concentration plasmatique de prolactine mais prévient également la ponte chez la poule naine. A l'opposé, nous avons observé que des dindes ayant exprimées la couvaison durant un premier cycle de production et ainsi traitées, durant la période de mue, vont à nouveau pondre mais expriment également la couvaison (Guémené, Morvan et Garreau-Mills, données non publiées). Ces résultats contradictoires peuvent être liés à la quantité d'anticorps présente dans le plasma chez les oiseaux immunisés et au rôle du VIP vis à vis de la sécrétion de la LH. Afin d'éviter les conséquences éventuelles d'effets secondaires d'immunisations dirigés contre des molécules situées en amont d'un mécanisme de régulation, nous avons également testé les effets d'une immunisation active dirigée directement contre la prolactine (Guémené *et al.*, 1994a,b).

Chronologiquement, le gène de la prolactine a été identifié chez la dinde (Karatzas *et al.*, 1990) puis, après clonage, a été inséré chez *E. coli* et la production *in vitro* de prolactine de dinde (rct-PRL) et d'une protéine de fusion (GST-tPRL), induite (Karatzas *et al.*, 1993). La prolactine de dinde (rct-PRL) a ensuite été utilisée pour induire la production d'anticorps anti-prolactine chez le lapin (Guémené *et al.*, 1994c) eux mêmes destinés à la réalisation du test d'immunisation passive précédemment décrit alors que la protéine de fusion a été utilisée directement chez la dinde pour la réalisation d'un test d'immunisation active. L'immunisation a été initiée durant la période de croissance et deux rappels ont été effectués durant la période de production

Les résultats obtenus indiquent que la protéine de fusion induit la formation d'anticorps anti-prolactine et une hyperprolactinémie chez la dinde. Les dindes ainsi activement immunisées sont également aptes à se reproduire et la ponte commence dans un délai similaire à celui des dindes témoins après photostimulation. Les dindes ainsi activement immunisées n'expriment pas la couvaison alors que plusieurs dindes (20 à 30%) des groupes témoins l'ont exprimée. En conséquence, les dindes du groupe traité pondent plus d'œufs (4 à 5 par dinde) que les dindes des groupes témoins. La présence d'anticorps anti-prolactine dans les œufs n'affecte pas non plus le développement embryonnaire, l'éclosabilité, la viabilité et la croissance ultérieure des descendants.

Conclusion

L'exposé des résultats obtenus durant ces dernières années montre qu'il existe maintenant au moins une voir plusieurs possibilités de prévention ou interruption de la couvaison en utilisant des procédés pharmacologiques. Il est donc maintenant primordial d'adapter les résultats de ces recherches pour une utilisation de ces procédés à l'échelle industrielle et de tester leur efficacité chez d'autres espèces d'oiseaux.

Références

- El Halawani M.E., Silsby J.L., Behnke E.J., Fehrer S.C., 1983. *Biol. Reprod.*, 28, 221-228.
El Halawani M.E., Silsby J.L., Behnke E.J., Fehrer S.C., 1986. *Biol. Reprod.*, 35, 59-67.
El Halawani M.E., Fehrer S.C., Silsby J.L., 1987. *Biol. Reprod.*, 36, 884-889.
El Halawani M.E., Silsby J.L., Rozenboim I., 1993. *Poult. Sci.*, 72, 94.
Guémené D., 1988. Thèse, ENSA et U. de Rennes. 253p.
Guémené D., Etches R.J., 1989a. *Reprod. Nut. Dev.*, 29, 469-476.
Guémené D., Etches R.J., 1989b. *Poult. Sci.*, 68, 1592-1594.
Guémené et Williams, 1989. *J. Endocrinol.*, 1989, 123, 85.
Guémené D., Williams, J.B., 1992. *Brit. Poult. Sci.*, 33, 153-163.
Guémené D., Zadworny D., Karatzas C., 1994a. Demande de brevet n°: 94/05550, 19 rev., 37p.
Guémené D., Crisóstomo-Pinto S., Kunhlein U., Garreau-Mills M., Zadworny D., 1994b. *Acte 7ème Coll. Biotechnocentre*, 58.
Guémené D., Bédécarrats G., Karatzas C., Garreau-Mills M., Kunhlein U., Crisóstomo-Pinto S., Zadworny D., 1994c. *Brit. Poult. Sci.*, en cours.
Hall T.R., Harvey S., Chadwick A., 1986. *Gen. Comp. Endo.*, 62, 171-184.
Hargis B.M., Burke W.H., 1984. *Gen. Comp. Endo.*, 55, 12.
Karatzas C., Zadworny D., Kunhlein U., 1990. *Nucl. Acids Res.*, 18, 3071.
Karatzas C., Guémené D., Kunhlein U., Zadworny D., 1993. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B, 273-280.
Lea R.W., Dods A.S.M., Sharp P.J., Chadwick, A., 1981. *J. Endocrinol.*, 91, 89-97.
Lienhart R., 1927. *C. R. Soc. Biol.*, 97, 1296-1297.
Macnamee M.C., Sharp P.J., Lea R.W., Sterling R.J., Harvey S., 1986. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 62, 470-478.
Mauro L.J., Youngren O.M., Proudman J. A., Phillips R.E., El Halawani M.E., 1992. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 87, 481-493.
Millam J.R., Burke W.H., El Halawani M.E., Ogren L.A., 1980. *Poult. Sci.*, 59, 1126-1131.
Opel H., Proudman J.A., 1980. *Poult. Sci.*, 59, 2550-2558.
Opel H., Proudman J.A., 1984. *J. Ster. Biochem.*, 20, 1565.
Pitts G.R., Youngren O.M., Silsby J.L., Foster L.K., Foster D.N., Rozenboim I., Phillips R.E., El Halawani M.E., 1994. *Biol. Reprod.* 50, 1350-1356.
Proudman J. A., Opel H., 1983. *Poult. Sci.*, 62, 1484-1485.
Renner P.A., Nestor K.E., Bacon W.N., Havenstein G.B., 1987. *Poult. Sci.*, 66, 558-560.
Riddle O., Bates R.W., Lahr E.L., 1935. *Am. J. Physiol.*, 111, 352-360.
Robinson B., Shafir Z., Perek M., Snapir N., 1984. *Poult. Sci.*, 63, 2268-2270.
Sharp P.J., Sterling R.J., de Milton L., Millar R.P., 1986. *Brit. Poult. Sci.*, 27, 129-135.
Sharp P.J., Sterling R.J., Talbot R.T., Huskisson N.S., 1989. *J. Endocrinol.*, 122, 5-13.
Sharp P.J., Sterling R.J., Talbot R.T., Huskisson N.S., 1993. *J. Reprod. Fert.*, 11, 38, 66.
Sharp P.J., Sterling R.J., 1986. *VIIth Eur. Poult. Conf.*, Paris, France. 2, 1029-1033.
Talbot R.T., Hanks M.C., Sterling R.J., Sang H.M., Sharp P.J., 1991. *Endocrinology*, 129, 496-502.
Thomer M.O., Perryman R.L., Rogol A.D., Conway B.P., Login I.S., Morris J.L., 1981. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53, 480-488.
Zadworny D., 1985. Ph.D. Thesis, University of Guelph, 176p.
Zadworny D., Shimada K., Ishida H., Sato K., 1989. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 74, 468-473.