



Production de cortisol chez le cheval à l'exercice et conséquences pratiques pour l'application des contrôles antidopages

V. LASSOURD, V. LAROUTE, M.A. POPOT*,
Y. BONNAIRE*, P.L. TOUTAIN

Unité associée INRA de Physiopathologie et
toxicologie expérimentales, ENVVT
23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex, FRANCE.

* L.A.B., Laboratoire de la société des courses
169, avenue de la Division Leclerc
92290 Châtenay-Malabry, FRANCE.

Résumé

Le cortisol est une hormone corticosurrénalienne utilisée pour le dopage et un seuil critique de 1 µg/ml à ne pas dépasser dans les urines a été fixé par les instances internationales. Dans le but de vérifier la spécificité du seuil, les taux de production et l'élimination urinaire du cortisol ont été évalués chez le cheval au repos et réalisant un exercice de longue durée (56 km, 12 km/h). L'exercice a multiplié par un facteur de 6 les taux de production de l'hormone (27 ± 5 µg/kg/h *versus* 4 ± 1 µg/kg/h). La cortisolurie, inférieure à 100 ng/ml au repos, a augmenté jusqu'à 300 ng/ml à l'arrivée de l'épreuve. Cette valeur est très inférieure au seuil critique international de 1 µg/ml. En revanche, après une administration de cortisol exogène, la cortisolurie a largement dépassé cette valeur. Il est conclu que ce test est très spécifique.

Mots-clés : Cheval - exercice - cortisol - production - élimination

Summary

Cortisol is an adrenal hormone used to improve performance and an urinary threshold of 1 µg/ml has been fixed by international authorities. In order to check the specificity of the threshold, cortisol production rates and elimination rates were assessed in horse at rest and during an endurance exercise (56 km, 12 km/h). Exercise resulted in a sixfold increase in cortisol production rates (27 ± 5 µg/kg/h *versus* 4 ± 1 µg/kg/h). At rest, the urine cortisol concentration was below 100 ng/ml and it increased till 300 ng/ml after the ride. This value is lower than the international cortisol threshold of 1 µg/ml. On the contrary, after exogenous administration of cortisol, urine cortisol concentration increased beyond the threshold. It is concluded that the test is specific.

Key-words : Horse - exercise - cortisol - production rate - elimination rate

INTRODUCTION

Le cortisol (hydrocortisone) est une hormone surrénalienne utilisée dans le but d'améliorer les performances chez le cheval. Un contrôle antidopage spécifique, c'est-à-dire qui n'est pas à l'origine de faux-positifs, exige de connaître la production maximale de l'hormone lors d'un exercice de longue durée, afin d'estimer la concentration maximale que l'on peut mesurer dans les urines et d'en déduire une valeur critique de cortisolurie. L'objectif de cette étude a été (i) de déterminer les taux de production physiologiques du cortisol chez le cheval au repos et réalisant un exercice de longue durée, (ii) d'étudier la cortisolurie physiologique dans les conditions de repos et d'exercice, (iii) de comparer les cortisoluries physiologiques obtenues à celles qui sont mesurées après une administration exogène de cortisol.

Matériel et Méthodes

Animaux

Cette étude a été menée sur 7 chevaux de sport adultes (4 hongres et 3 juments).

Expérience 1

Lors d'une première expérience, les taux de production physiologiques du cortisol et les taux d'excrétion urinaire du cortisol ont été déterminés chez six chevaux au repos et réalisant un exercice de longue durée.

Expérience 2

Lors d'une deuxième expérience, six chevaux ont reçu une administration de cortisol à dose pharmacologique dans les conditions de repos et au cours d'un exercice de longue durée.

Conditions expérimentales

Lors des essais réalisés dans les conditions de repos, les animaux ont été maintenus dans leurs box. Pour les essais réalisés dans les conditions d'exercice, les chevaux ont réalisé une course d'endurance de 56,4 km en effectuant des boucles de 5400 m, parcourues en moyenne à la vitesse de 12 km/h. L'épreuve a eu lieu de 9h30 à 16h avec une pause d'une heure de 12h30 à 13h30. De plus, les chevaux ont été arrêtés 3 min toutes les 27 minutes pour la réalisation des prélèvements sanguins.

Les administrations intraveineuses de cortisol ont été réalisées vers 11h, soit 1h30 après le début de la course, dans les conditions d'exercice.

Principes actifs

Dans la première expérience, les taux de production physiologiques du cortisol ont été déterminés après une administration de cortisol radioactif : le cortisol tritié ([1, 2, 6, 7-³H]Cortisol, TRK 407, 80 Ci/mmol, Amersham France). Dans la deuxième expérience, les chevaux ont reçu une administration de cortisol "froid" (Hydrocortisone, Sigma Chemical Co, St-Louis, Mi, USA).

Administrations et prélèvements

Le cortisol tritié et le cortisol froid ont été injectés par voie intraveineuse dans la veine jugulaire droite au moyen d'un cathéter vers 11h. Le cortisol tritié a été administré à la dose totale d'environ 1 mCi (soit environ $3.5 \cdot 10^6$ dpm/kg), le cortisol froid a été administré à la dose de 1 mg/kg.

Le sang a été prélevé toutes les 30 min de 8h30 à 11h le lendemain ; des prélèvements sanguins supplémentaires ont été réalisés à 1, 2, 4, 8, 15 et 30min après les administrations de cortisol. Le sang (5 ml) prélevé par ponction directe de la veine jugulaire gauche a été recueilli sur tube hépariné, puis centrifugé à 1400 g pendant 10min. Le plasma récupéré a été conservé à -20°C jusqu'au dosage.

La totalité des urines émises pendant chaque expérience a été récupérée. Pour les hongres, les urines produites par miction spontanée ont été collectées au moyen d'urinaux. Pour les juments, les urines ont été recueillies par l'intermédiaire d'une sonde urinaire (sonde de Foley, CH 30, Rusch, France) maintenue ou bien placée dans l'urètre à intervalles de temps rapprochés. A chaque prélèvement, un échantillon de 20 ml a été prélevé et centrifugé à 1400 g pendant 10min, le surnageant a ensuite été placé à -20°C jusqu'au dosage.

Techniques analytiques

Le cortisol plasmatique a été mesuré au moyen de la technique HPLC précédemment décrite (Alvinerie et Toutain, 1982). La limite de quantification a été de 2 ng/ml. La radioactivité liée au cortisol tritié a été mesurée au moyen d'un couplage HPLC / scintillation liquide. Le cortisol urinaire a été dosé selon une méthode HPLC validée. La limite de quantification est de 20 ng/ml ; la répétabilité et la reproductibilité sont inférieures à 10% à 20 ng/ml.

Analyse des données

Analyse pharmacocinétique

Pour chaque cheval, les données de radioactivité liées au cortisol tritié ont été ajustées par une équation triexponentielle correspondant à un modèle tricompartimental ouvert avec élimination à partir du compartiment central. La clairance (ml/kg/h) du cortisol a été calculée avec l'équation 1 :

$$Cl = \text{Dose} * AUC \quad (1)$$

avec Dose, la dose de cortisol tritié administrée (dpm/kg) et AUC (dpm*h/ml), l'aire sous la courbe de la radioactivité du cortisol tritié calculée par intégration mathématique de l'équation triexponentielle. Le volume du compartiment central (ml/kg) a été calculé avec l'équation 2 :

$$V_c = \text{Dose} / A_0 \quad (2)$$

Dans l'équation 2, A_0 représente la radioactivité initiale.

Le volume de distribution à l'équilibre (ml/kg) du cortisol a été déterminé avec l'équation 3 :

$$V_{ss} = V_c \left(1 + \sum_{i=1}^n \frac{k_{ij}}{k_{ji}} \right) \quad (3)$$

Dans l'équation 3, k_{ij} sont les constantes de premier ordre traduisant les échanges entre les compartiments 1, 2 et 3 du modèle.

Les productions ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de cortisol ont été calculées avec l'équation 4 :

$$\text{Production} = AUC_{\text{cort}} * Cl \quad (4)$$

avec AUC_{cort} , l'aire sous la courbe de la cortisolémie (ng*h/ml) sur l'intervalle de temps considéré et Cl, la clairance du cortisol précédemment définie (équation 1).

Analyse des données urinaires

La quantité totale d'urine produite sur 24h a été calculée par la somme des volumes récupérés à chaque miction.

Les pourcentages de récupération de la production endogène de cortisol ou de la dose de cortisol exogène administrée ont été calculés en effectuant le rapport de la somme des quantités de cortisol recueillies à chaque miction sur la production endogène de cortisol sur la période de temps considérée ou sur la dose de cortisol administrée. La production endogène de cortisol sur l'intervalle de temps considéré a été estimée par l'analyse pharmacocinétique des profils de cortisolémies (équation 4).

Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel Statgraphics (Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA). Les valeurs sont reportées par leur moyenne et écart-type. L'influence de l'activité sur les paramètres a été évaluée avec une ANOVA à 2 facteurs : activité (repos ou exercice) et cheval. Les différences sont significatives pour $P < 0.05$. La comparaison des valeurs de cortisoluries en fonction de l'intervalle de temps de collecte des urines a été réalisée avec un test de comparaisons multiples selon Bonferroni. Une analyse descriptive globale des cortisoluries dans les deux conditions expérimentales a été réalisée.

Résultats

Profils physiologiques de cortisolémie

La figure I présente le profil moyen de la cortisolémie chez six chevaux maintenus au repos ou bien ayant réalisé un exercice d'endurance au cours du nyctémère. L'examen de cette figure montre que les variations physiologiques de cortisolémie présentent une rythmicité sur le nyctémère dans les conditions de repos. Ce rythme est modifié de façon transitoire par la présence d'un pic de cortisolémie dû au stress (modéré) lié à la mise en place du cathéter et aux premiers prélèvements sanguins. Chez les chevaux au repos, la cortisolémie moyenne a varié d'un minimum de 22.2 ± 20.6 ng/ml relevé à 20h30 pour atteindre un maximum de 52.0 ± 10.4 ng/ml à 12h.

L'évolution rythmique de la cortisolémie sur le nyctémère est modifiée lors des tests d'endurance où les variations de la cortisolémie ont suivi précisément les changements d'activité. Une hypercortisolémie est apparue à chaque départ d'exercice et la cortisolémie a présenté une décroissance immédiate à chaque arrêt de l'exercice : arrêt d'environ 20 minutes nécessaire à la pose des cathéters et à la réalisation des premiers prélèvements sanguins, pause d'une heure entre les deux phases de l'exercice et arrêt final de la course.

Au cours de la première phase d'exercice, les cortisolémies ont augmenté jusqu'à un maximum de 92.4 ± 29.2 ng/ml à $11h38 \pm 48$ min. Au cours de la deuxième phase, le pic de cortisolémie a été de 120.5 ± 36.6 ng/ml atteint à $15h44 \pm 17$ min, soit lors du dernier ou de l'avant-dernier prélèvement de la course. Après l'arrêt final de l'exercice, les cortisolémies ont présenté une décroissance régulière et le retour aux valeurs de repos a été observé en 2h30.

Disposition du cortisol endogène

L'évolution de la radioactivité du cortisol tritié après une administration intraveineuse de cortisol tritié chez un cheval représentatif est présentée sur la figure II. L'inspection visuelle montre que la radioactivité disparaît du plasma plus rapidement lors de la réalisation de l'exercice que dans les conditions de repos. La clairance totale du cortisol a été de 137 ± 34 ml/kg/h dans les conditions de repos et de 338 ± 95 ml/kg/h dans les conditions d'exercice (ANOVA, $P < 0.001$). Le volume de distribution à l'équilibre de 229 ± 18 ml/kg au repos a augmenté à 359 ± 82 ml/kg lors de l'exercice (ANOVA, $P < 0.01$). Le temps de demi-vie plasmatique de 1.55 ± 0.33 h au repos a diminué à 0.97 ± 0.16 h à l'exercice (ANOVA, $P < 0.05$).

Taux de production du cortisol

La production journalière de cortisol de 108 ± 24 µg/kg chez les chevaux au repos a été augmentée à 294 ± 64 µg/kg pour le nyctémère incluant le test d'exercice ($P < 0.01$). La production de cortisol pendant le temps correspondant à l'épreuve d'endurance jusqu'au retour à des concentrations de repos (de 9h30 à 18h30) a été de 40 ± 8 µg/kg au repos et de 227 ± 60 µg/kg à l'exercice, soit une multiplication par un facteur de 6 ($P < 0.001$) des taux de production physiologiques du cortisol.

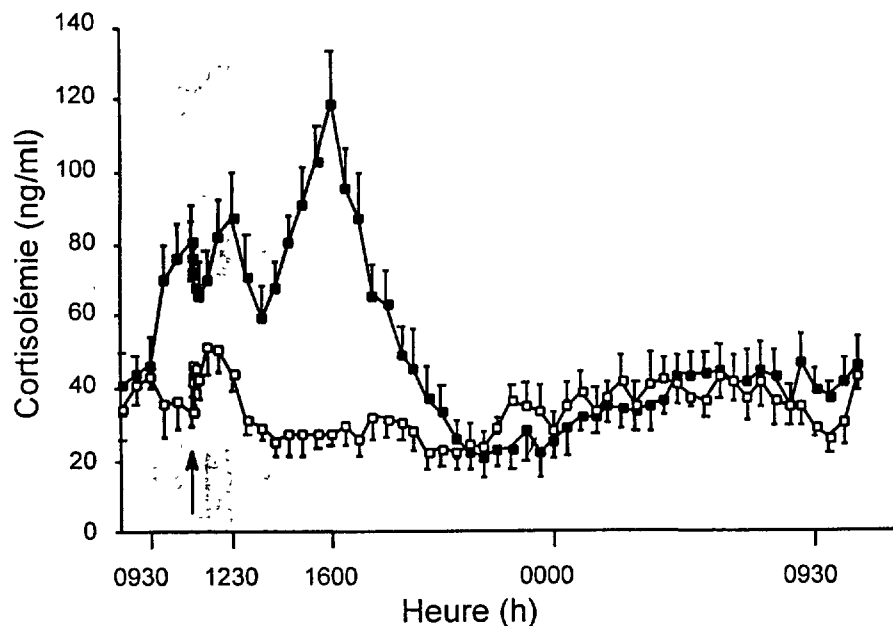


Figure I : Evolution du profil moyen ($m \pm sem$) de la cortisolémie (ng/ml) chez six chevaux au cours d'un nyctémère au repos (\square) et incluant un exercice d'endurance (\blacksquare). La course d'endurance (56 km à 12 km/h) a été réalisée de 9h30 à 16h00 avec une pause de 12h30 à 13h30 et un arrêt nécessaire à l'administration intraveineuse de cortisol tritié (flèche). Les périodes de course sont représentées par les rectangles grisés.

Figure I : Plasma cortisol concentration (ng/ml) profile in six horses ($m \pm sem$) during a rest day (\square) and during a day that included an endurance ride (\blacksquare). Endurance ride was carried out between 9:30 to 16:00 with a one-hour stop at 12:30 and a short stop for intravenous tritiated cortisol administration (arrow). Shaded rectangle areas represent the exercising periods.

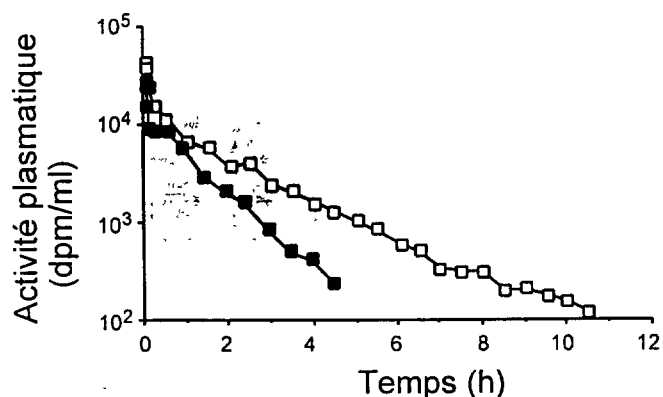


Figure II : Evolution en coordonnées semi-logarithmiques de la radioactivité du cortisol tritié (dpm/ml) déterminée chez un cheval représentatif après une administration intraveineuse d'un bolus de cortisol tritié (1 mCi) dans les conditions de repos (\square) et d'exercice d'endurance (\blacksquare). L'administration de cortisol tritié a été réalisée à 11h00. Les périodes de course sont représentées par les rectangles grisés.

Figure II : Semilogarithmic plot of tritiated cortisol activity (dpm/ml) in a representative horse after an intravenous administration of tritiated cortisol (1 mCi) during a rest day (\square) and during a day that included an endurance ride (\blacksquare). [^3H]cortisol was injected at 11:00. Shaded rectangle areas represent the exercising periods.

Analyse des données urinaires

Productions d'urines

Dans les conditions physiologiques, la production d'urine sur le nycthémère au repos a été de 4295 ± 1182 ml et de 4574 ± 875 ml sur le nycthémère incluant l'exercice d'endurance. Après l'administration de cortisol à forte dose, la production d'urine a été de 4810 ± 1208 ml au repos et de 5517 ± 992 ml sur le nycthémère incluant l'exercice. Les différences entre les différentes conditions expérimentales n'ont pas été significatives ($P > 0.05$). La diurèse moyenne générale a été de 4787 ± 1118 ml/24h correspondant à une production d'urine moyenne générale de 9.83 ± 2.36 ml/kg/24h.

Description des cortisoluries

L'évolution des cortisoluries individuelles de l'expérience 1 en fonction des intervalles de temps est présentée sur la figure IIIA. Dans les conditions physiologiques, les cortisoluries ont été inférieures à 100 ng/ml avec 72% des échantillons présentant une valeur inférieure à la limite de quantification (20 ng/ml). Chez les chevaux au repos, il n'a pas été mis en évidence de rythme circadien de la cortisolurie contrairement à ce qui est observé dans le plasma (Toutain et al., 1988a et b). La réalisation de l'exercice a induit une augmentation des cortisoluries jusqu'à 108 ± 64 ng/ml lors de la pause entre les deux phases de l'exercice et 170 ± 70 ng/ml à l'arrivée de l'exercice. La cortisolurie maximale individuelle a été comprise entre 112 et 283 ng/ml. La cortisolurie des échantillons recueillis lors de la phase de repos qui a suivi la course a été significativement supérieure à la cortisolurie de repos ($P < 0.05$, test de comparaisons multiples selon Bonferroni). Le retour à des valeurs de repos a été observé en moins de 10h.

La figure IIIB montre l'évolution des cortisoluries individuelles chez six chevaux ayant reçu une administration de cortisol à la dose de 1 mg/kg (expérience 2). La cortisolurie maximale comprise entre 760 et 21967 ng/ml a été atteinte dès la première miction qui a suivi l'injection intraveineuse, soit entre 1 et 6h après l'administration, puis la cortisolurie a présenté une décroissance régulière. La cortisolurie a été inférieure à 2000 ng/ml dans les 3h après l'administration de cortisol, inférieure à 1000 ng/ml dans les 6h et elle est retournée à des valeurs inférieures à 100 ng/ml dans les 21h qui ont suivi l'administration de cortisol. L'exercice n'a pas eu d'influence sur la cortisolurie faisant suite à l'administration de la dose pharmacologique de cortisol ($P > 0.05$).

Quantités de cortisol excrétées par les urines

Dans les conditions physiologiques, les quantités de cortisol éliminées par les urines ont été de 61 ± 27 µg/24h le jour du repos et de 312 ± 208 µg/24h le jour de l'exercice, soit moins de 0,5% de la production endogène de cortisol dans les deux cas.

Après l'administration de cortisol à la dose de 1 mg/kg, les quantités de cortisol recueillies dans les urines ont été de $5,2 \pm 5,2$ mg/24h sur le nycthémère au repos et de $6,2 \pm 3,8$ mg/24h sur le nycthémère incluant l'exercice ; ces valeurs correspondent à moins de 3 % de la dose administrée. Pour chaque expérience, les quantités de cortisol récupérées dans les deux conditions expérimentales (repos *versus* exercice) n'ont pas été différentes ($P > 0.05$).

Discussion

L'objectif de ce projet a été d'étudier la cortisolurie après stimulation maximale de la surrénale par la réalisation d'un exercice de longue durée pour la comparer aux valeurs obtenues après une administration exogène de cortisol (1 mg/kg).

Pour évaluer la production maximale de cortisol par un cheval, l'exercice d'endurance a été sélectionné parce qu'il a été montré que c'est avec ce type d'exercice que sont obtenues les augmentations de cortisolémie les plus importantes (Linden et al., 1991). De plus, l'exercice de longue durée permet de réaliser la cinétique de décroissance de l'activité du cortisol tritié dans des conditions stables.

Dans une première partie, la production physiologique de cortisol endogène a été évaluée avec des procédures standard de pharmacocinétique. Pour cela, la clairance du cortisol et les profils de cortisolémie ont été déterminés. Le calcul d'une clairance nécessite d'administrer le principe actif par

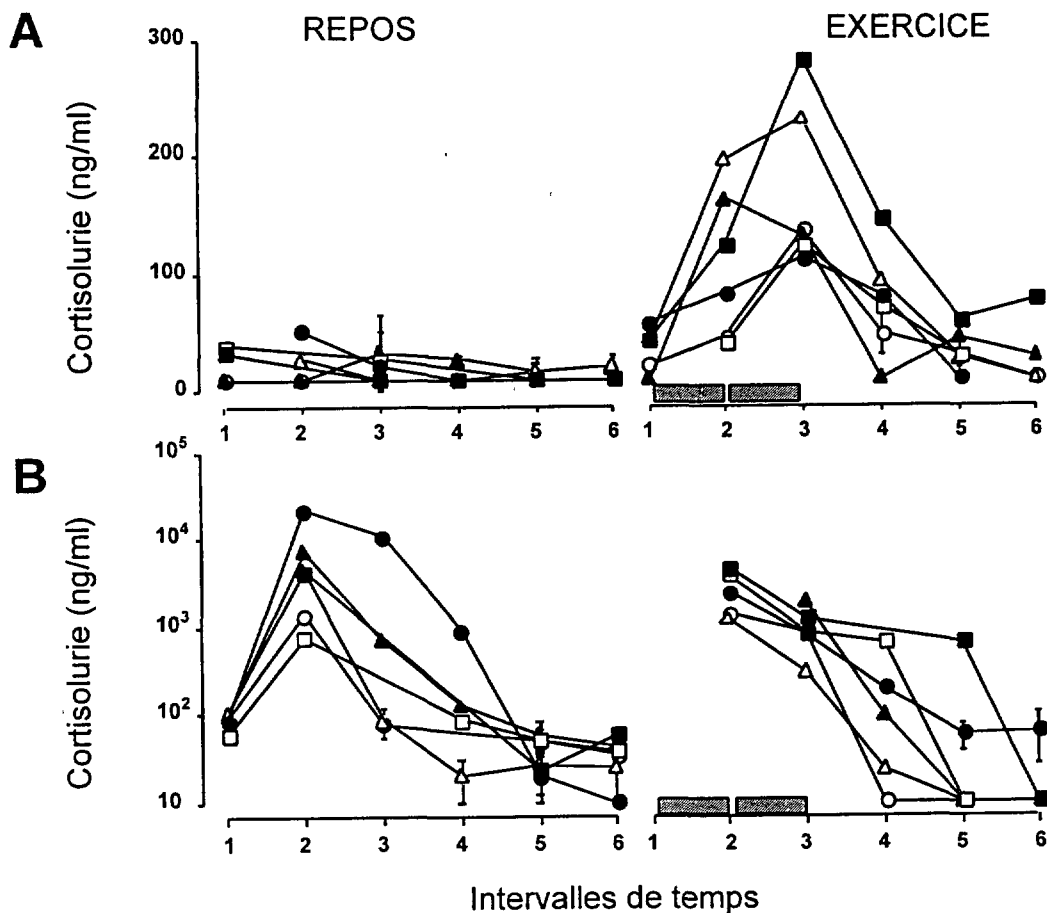


Figure III : Evolution des cortisoluries individuelles (ng/ml) de six chevaux au cours d'un nycthémère au repos (partie gauche) et incluant un exercice de longue durée (partie droite), sans (A) et avec (B) administration de cortisol à dose massive. Les périodes de course sont représentées par les rectangles grisés.

Intervalles de temps : 1 : de 8h30 à 9h30 (avant le départ, dans les conditions d'exercice) ; 2 : de 9.30 à 13h30 (pendant la pause) ; 3 : de 13h30 à 18h50 (première miction après l'arrêt de la course) ; 4 : de 18h50 à 23h00 ; 5 : de 23h00 à 9h30 (le lendemain) ; 6 : de 9h30 à 11h30 (le lendemain).

Figure III : Urine cortisol concentration (ng/ml) time course in six horses during a rest day (left panel) and during a day that included an endurance ride (right panel) in the absence (A) and with (B) a massive cortisol administration. Shaded rectangle areas represent the exercising periods.

Time intervals : 1 : from 8:30 to 9:30 (before the ride) ; 2 : from 9:30 to 13:30 (during the main stop of the ride) ; 3 : from 13:30 to 18:50 (up to the first micturition after the end of the ride) ; 4 : from 18:50 to 23:00 ; 5 : from 23:00 to 9:30 (second day); 6 : from 9:30 to 11:00 (second day).

voie intraveineuse et de suivre sa courbe de disparition plasmatique. Dans le cas du cortisol, le calcul de la clairance a impliqué d'utiliser du cortisol à dose traçante, le cortisol radioactif, afin de ne pas modifier les profils physiologiques du cortisol. Ainsi, il a été montré que la réalisation d'un exercice de longue durée induisait une augmentation par un facteur de 6 de la production physiologique de cortisol de repos. Cette augmentation est beaucoup plus importante que ne le suggère l'augmentation des cortisolémies parce que la clairance du cortisol aussi est très augmentée (x 3) (Lassourd et al., 1996).

Au cours de cette étude, la production d'urine a été mesurée afin d'évaluer l'éventuelle influence de l'exercice sur une augmentation ou une diminution de la diurèse, ce qui modifierait indirectement les concentrations urinaires en cortisol. L'absence d'effet de l'exercice sur les volumes éliminés a permis d'exploiter les données brutes sans inclure de facteur de correction de dilution. De plus, compte tenu des faibles valeurs de diurèse par rapport à d'autres auteurs (Kohn & Strasser, 1986 ; Rumbaugh et al., 1982), les valeurs de cortisolurie obtenues sont probablement parmi les plus élevées et garantissent la spécificité du test.

L'augmentation de production de cortisol lors de l'exercice a directement influencé la cortisolurie en augmentant la quantité de cortisol éliminée tandis que la proportion de cortisol excrété par voie urinaire n'a pas été modifiée. Ce résultat est original puisque l'exercice a accru les concentrations plasmatiques en cortisol au-delà de la capacité maximale de transport de la CBG (Corticosteroid Binding Globulin) (Gayrard et al., 1996) augmentant ainsi considérablement la fraction libre de cortisol directement disponible pour être éliminée. En conséquence, chez le cheval n'ayant pas reçu de médication particulière, il est peu probable que la cortisolurie dépasse 100 ng/ml dans les conditions de repos et 300 ng/ml après un exercice (Toutain et al., 1995), c'est-à-dire une augmentation insuffisante de la cortisolurie pour dépasser le seuil critique de 1 µg/ml (Popot et al., 1997).

Après l'administration d'une dose massive de cortisol (1mg/kg), les cortisoluries ont atteint un maximum dont la valeur dépend du délai entre l'injection et la première miction. Le retour à des concentrations inférieures à 100 ng/ml a été réalisé en 21h, en général après la troisième miction qui a suivi l'administration de cortisol. La réalisation de l'exercice a été sans influence sur la cortisolurie faisant suite à une administration pharmacologique de cortisol. Ce résultat suggère que les modifications hémodynamiques impliquées dans l'adaptation des chevaux à l'exercice sont sans conséquence sur l'élimination urinaire du cortisol.

Conclusion

Il est conclu que même dans des conditions physiologiques intenses en matière de stimulation de la glande surrénale, la cortisolurie ne peut excéder la valeur critique de 1 µg/ml adoptée lors de la "Conférence internationale des autorités hippiques" en janvier 1994. En revanche, cette concentration peut être dépassée après une administration frauduleuse de cortisol sous réserve d'effectuer les prélèvements urinaires dans les 6h qui suivent l'administration de cortisol par voie intraveineuse. Le seuil de cortisolurie de 1µg/ml apparaît spécifique (peu de risque de faux-positifs) pour l'application des contrôles antidopages chez le cheval.

Références bibliographiques

Alvinerie M & Toutain PL - Simultaneous determination of corticosterone, hydrocortisone and dexamethasone in dog plasma using high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Science* 71 : 816-818, 1982.

Gayrard V, Alvinerie M., & Toutain P.L., 1996 - Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domestic Animal Endocrinology* 13(1) : 35-45.

Linden A., Art T., Amory H., Desmecht D. & Lekeux P., 1991 - Effect of 5 different types of exercise, transportation and ACTH administration on plasma cortisol concentration in sport horses. In: *Equine Exercise Physiology 3* (Persson SGB, Lindholm A and Jeffcott LB) ICEEP Publication, Davis, CA, pp.391-396.

Kohn C.W., & Strasser S.L., 1986- 24-Hour renal clearance and excretion of endogenous substances in the mare. *American Journal of Veterinary Research* 47 : 1332-1337.

Lassourd V., Gayrard V., Laroute V., Alvinerie M., Bénard P., Courtot D. & Toutain P.L., 1996 - Cortisol disposition and production rates in horse during rest and exercise. *American Journal of Physiology* 271 : R25-R33.

Popot M.A., Houghton E., Ginn A., Jones M., Teale P., Samuels T., Lassourd V., Dunnett N., Cowan D.A., Bonnaire Y. & Toutain P.L., - Cortisol concentration in post-competition horse urine : a french and British survey. *Equine Veterinary Journal* (in press)

Rumbaugh G.E., Carlson G.P., Harrold D., 1982 - Urinary production in the healthy horse and in horses deprived of feed and water. *American Journal of Veterinary Research* 43 : 735-737.

Toutain P.L., Lassourd V., Popot M.A., Laroute V., Alvinerie M. & Bonnaire Y., 1995 - Urinary cortisol excretion in the resting and exercising horse. *Equine Veterinary Journal Supplement 18* : 457-462.

Toutain P.L., Laurentie M., Autefage A. & Alvinerie M., 1988a - Hydrocortisone secretion : production rate and pulse characterization by numerical deconvolution. *American Journal of Physiology* 255 :E688-E695.

Toutain P.L., Oukessou M., Autefage A. & Alvinerie M., 1988b - Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domestic Animal Endocrinology* 5 : 55-59.

