

## ÉTUDE ÉLECTROMYOGRAPHIQUE DE L'ORGANISATION DE LA MOTRICITÉ UTÉRINE AU COURS DE L'ŒSTRUS CHEZ LA BREBIS

Marie-Jeanne PRUD'HOMME

*Station de Physiologie de la Reproduction,  
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,  
Nouzilly, 37380 Monnaie*

---

### RÉSUMÉ

Que ce soit chez la Brebis castrée puis traitée aux oestrogènes ou chez la Brebis cyclique au cours de l'œstrus, l'analyse des enregistrements de l'activité électromyographique du myomètre en 3 ou 4 points de l'utérus montre que :

— Soixante p. 100 environ des contractions se propagent de la jonction utéro-tubaire (JUT) vers le cervix.

— Il existe une relation entre le sens de propagation des contractions et leur fréquence. Pour les faibles fréquences (2 par mn) la propagation s'effectue principalement dans le sens JUT-cervix. Lors des périodes de fréquence élevée (4 à 5 par mn) qui se reproduisent spontanément 2 à 3 fois par heure, les contractions se propagent principalement du cervix vers la jonction utéro-tubaire ou bien ne présentent pas d'organisation définie.

---

### INTRODUCTION

Un certain nombre de travaux réalisés sur la motricité utérine, chez la Brebis pendant l'œstrus, concernent la propagation des contractions le long des cornes utérines. Les études ont été effectuées sous anesthésie, soit par l'observation directe ou cinématographique de l'utérus (CROKER et SHELTON, 1973 ; HAWK et ECHTERNKAMP, 1973), soit par l'enregistrement des pressions endocavitaires aux deux extrémités de la corne utérine (MANN, 1969). Les résultats montrent que les contractions se propagent principalement du cervix vers l'extrémité ovarienne de la corne. Mais les variations de la pression intra-utérine ne décrivent qu'une activité globale de

l'utérus et les observations, pendant un temps limité, des contractions et de leur propagation, ne renseignent pas de façon précise sur l'organisation de la motricité.

Nous avons donc repris le problème en utilisant les techniques électromyographiques (EMG) qui permettent de multiplier sur un organe, les sites d'enregistrement ponctuel. En recueillant l'activité électrique du myomètre en 3 ou 4 points d'une même corne chez la Brebis en œstrus, anesthésiée ou éveillée, nous pouvons analyser, dans de bonnes conditions, l'organisation de la motricité utérine chez cette espèce.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Nous utilisons pour cette étude 10 brebis de race *Préalpes*, soit castrées puis traitées aux œstrogènes, soit cycliques. Les expériences sont réalisées *in vivo*, dans des conditions aiguës ou chroniques, au cours des 15 premières heures de l'œstrus comportemental, détecté dans tous les cas par le Bélier, c'est-à-dire au moment où la fréquence moyenne des contractions utérines est la plus élevée (ROUSSEAU et PRUD'HOMME, 1974).

Dans les conditions expérimentales aiguës, la brebis castrée est anesthésiée le jour de l'œstrus induit, soit 24 heures après l'administration de 50 µg de benzoate d'œstradiol. L'anesthésie est induite par l'injection intraveineuse de barbituriques (mélange de penthotal et de nembutal). Elle est entretenue par l'inhalation de vapeurs d'halothane. L'utérus est extériorisé et maintenu au milieu d'une cuvette constituée par la peau et remplie d'huile de paraffine à 38°C afin d'éviter la dessiccation et le refroidissement de l'organe. On peut alors enregistrer l'activité électrique du myomètre à l'aide d'électrodes bipolaires, constituées de deux fils de cuivre posés sur la séreuse. Nous disposons sur une corne utérine 3 électrodes, distantes de 1 à 1,5 cm. Une quatrième électrode est placée sur l'autre corne en regard de l'une des 3 précédentes.

Dans les conditions expérimentales chroniques, nous plaçons à demeure 3 ou 4 électrodes bipolaires de platine, suturées sur la paroi d'une même corne utérine et distantes de 2 à 3 cm (ROUSSEAU et PRUD'HOMME, 1974) ; une électrode supplémentaire est également mise en place sur l'autre corne.

Dans tous les cas, les activités électriques du myomètre, après amplification, sont enregistrées sur papier, grâce à un inscripteur à plumes classique.

L'analyse des résultats est effectuée à partir d'enregistrements d'une durée moyenne d'une heure ou de séquences de courte durée (5 mn). Nous notons le pourcentage des salves qui apparaissent successivement sous les électrodes, dans le sens jonction utéro-tubaire (JUT)-cervix, dans le sens cervix-JUT et celui des salves dont l'ordre d'apparition sous les électrodes ne permet pas de caractériser l'un de ces deux sens.

## RÉSULTATS

### A. — Enregistrement des activités EMG du myomètre par des électrodes disposées sur les deux cornes utérines

Les activités EMG ne sont pas recueillies aux mêmes moments sur les deux cornes, en des points symétriques, leur délai d'apparition pouvant varier de 0,5 à 40 s. Leur fréquence, elle aussi, varie d'une corne à l'autre ; par exemple, sur une période d'une heure, la fréquence moyenne des salves est de 1,5 par mn sur une corne ; elle est de 1,8 par mn sur l'autre. Ces résultats sont observés, aussi bien chez la Brebis castrée, traitée, anesthésiée (fig. 1 A) ou éveillée (fig. 1 B) que chez la Brebis cyclique éveillée (fig. 1 C).

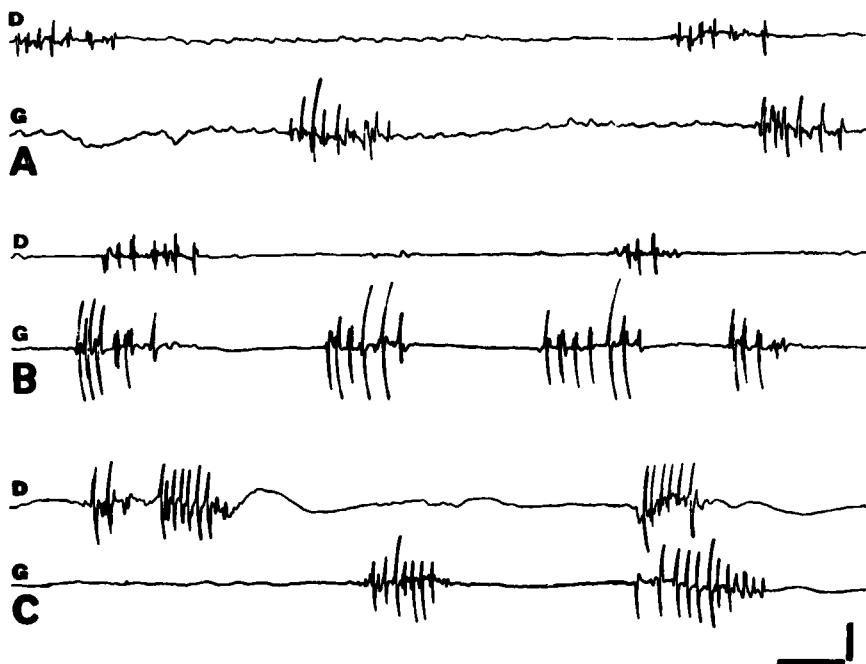


FIG. 1. — Enregistrement de l'activité électrique du myomètre chez la Brebis au même niveau de chaque corne utérine

D : corne utérine droite  
G : corne utérine gauche

A : chez la Brebis castrée, anesthésiée, en œstrus induit  
B : chez la Brebis castrée, éveillée, en œstrus induit  
C : chez la Brebis cyclique, éveillée, au cours de l'œstrus

Étalonnages : amplitude : 100  $\mu$ V (A)  
500  $\mu$ V (B)  
200  $\mu$ V (C)

temps : 5 s

*B. — Enregistrement des activités EMG du myomètre par des électrodes disposées sur une génératrice d'une même corne utérine*

1. Chez la Brebis castrée, traitée, anesthésiée, les activités EMG n'apparaissent pas simultanément au niveau des différentes électrodes. Ainsi la figure 2 montre que l'activité électrique est enregistrée successivement soit par les électrodes A, B et C dans le sens JUT-cervix, soit par les électrodes C, B et A dans le sens cervix-JUT. L'analyse réalisée à partir de tracés de durée moyenne d'une heure montre que la propagation dans le sens JUT-cervix s'observe pour 65 p. 100 des contractions ; pour 28 p. 100 d'entre elles, elle s'effectue dans le sens cervix-JUT (tabl. 1). La vitesse de propagation est semblable dans les deux cas (2 cm/s) (tabl. 2). Enfin, d'autres modalités de propagation sont observées pour 7 p. 100 des contractions ; la figure 2 montre, par exemple, une activité qui, enregistrée d'abord sous l'électrode intermédiaire B, se propage dans les deux directions opposées, vers la jonction utéro-tubaire (électrode A) et vers l'extrémité cervicale (électrode C).

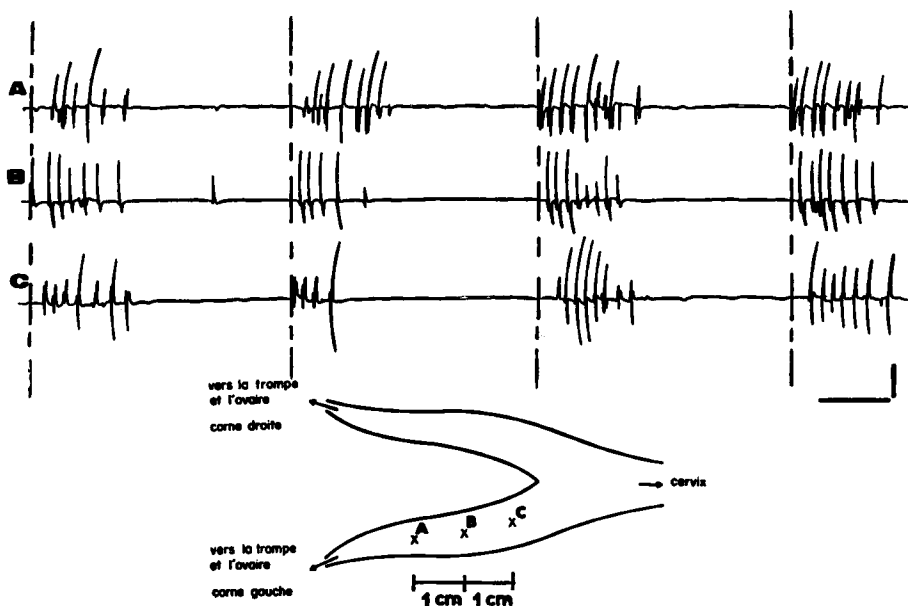


FIG. 2. — Enregistrement de l'activité électrique du myomètre chez une brebis castrée, anesthésiée 24 heures après l'injection de benzoate d'œstradiol, en 3 points d'une même corne utérine.

A, B et C : activité électrique dérivée respectivement par les électrodes A, B et C dont la position est indiquée sur le schéma.

Un trait pointillé vertical passant par le début de la salve apparaissant la 1<sup>re</sup> permet d'apprécier l'ordre d'apparition des salves. Noter que pour la première série d'activité, la propagation s'effectue à partir du point médian B vers les extrémités A et C.

Étalonnages : amplitude : 200  $\mu$ V  
temps : 5 s

TABLEAU I

Ordre d'apparition des salves de potentiels chez des brebis castrées en œstrus induit et chez des brebis cycliques en œstrus

	Nombre de brebis	Nombre de salves	Fréquence moyenne par mn	Pourcentage de salves apparaissant dans le sens :		
				* JUT-cervix	cervix-* JUT	autres successions
Brebis castrées anesthésiées en œstrus induit	3	385	2,0 (1,5-2,5)	65,0 (63-67)	28,0 (26-30)	7,0 (5-9)
Brebis castrées éveillées en œstrus induit	3	530	2,6 (2,0-3,7)	61,0 (40-73)	26,0 (13-52)	13,0 (12-14)
Brebis cycliques éveillées en œstrus	4	726	2,3 (2,1-2,7)	59,0 (50-70)	16,0 (11-27)	25,0 (16-35)

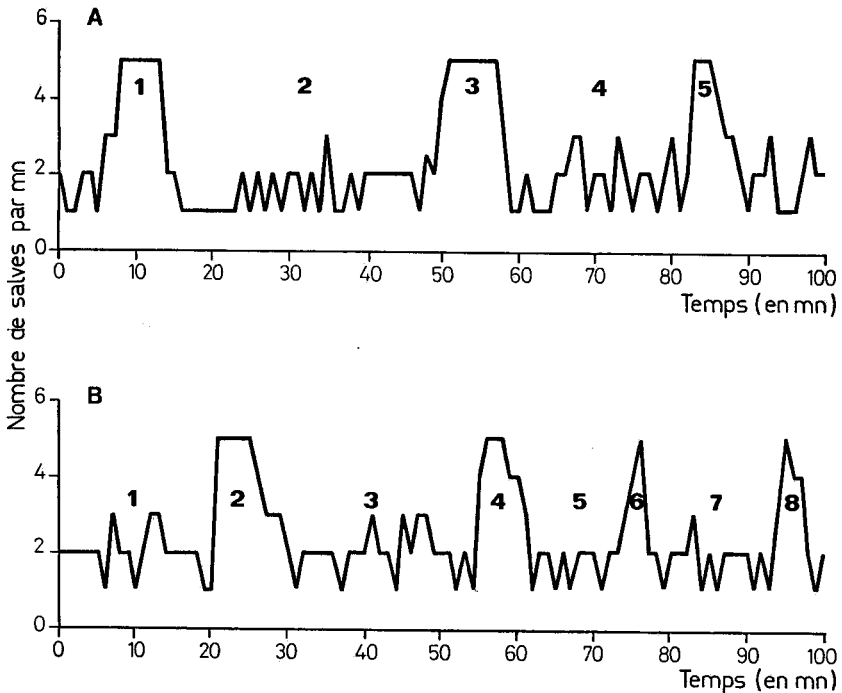
\* JUT = jonction utéro-tubaire.  
m ; ( ) valeurs extrêmes.

**TABEAU 2**

*Vitesse de propagation de l'activité EMG du myomètre  
chez des brebis castrées en œstrus induit  
et chez des brebis cycliques en œstrus*

	Nombre de brebis	Vitesse de propagation ascendante (VA) (cervix-JUT) en cm/s	Vitesse de propagation descendante (VD) (JUT-cervix) en cm/s	Différence entre VA et VD
Brebis castrées anesthésiées en œstrus induit	3	2,08 ± 0,51 (1,60 — 2,35)	2,07 ± 0,64 (1,61 — 2,33)	Pas de différence significative (P > 0,05)
Brebis castrées éveillées en œstrus induit	3	2,79 ± 1,92 (1,67 — 4,22)	2,81 ± 1,58 (2,12 — 4,37)	Pas de différence significative (P > 0,05)
Brebis cycliques éveillées en œstrus	4	3,18 ± 0,95 (2,25 — 3,61)	4,52 ± 1,64 (2,73 — 5,42)	VA < VD (P < 0,01)

m ± sd ; ( ) valeurs extrêmes.



**FIG. 3. — Évolution de la fréquence des salves de potentiels mesurée par mn :**

A : chez une brebis castrée, éveillée, au cours de l'œstrus induit

B : chez une brebis cyclique, éveillée, au cours de l'œstrus

Des périodes de forte activité se répètent régulièrement toutes les 30 à 40 mn (périodes 1, 3 et 5 A ; périodes 2, 4, 6 et 8 B).

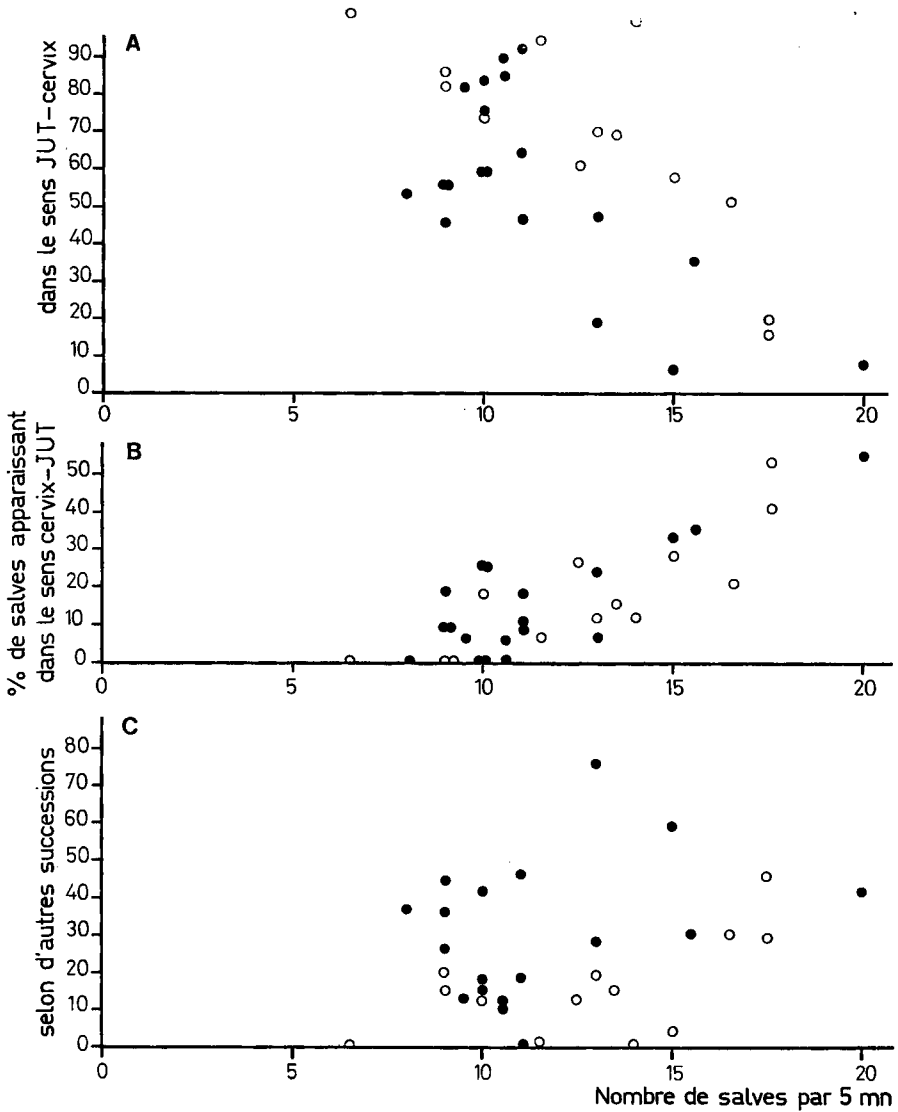


FIG. 4. — Rapports entre la fréquence et l'ordre d'apparition des salves chez 3 brebis castrées, éveillées, en œstrus induit (○) et chez 4 brebis cycliques, éveillées, en œstrus (●).

A) Il existe une forte corrélation négative entre le pourcentage des salves apparaissant dans le sens JUT-cervix et leur fréquence

$$\text{(brebis castrées traitées)} \quad r = -0,82 \quad P < 0,01$$

$$\text{(brebis cycliques)} \quad r = -0,68 \quad P < 0,01$$

B) Il existe une forte corrélation positive entre le pourcentage des salves apparaissant dans le sens cervix-JUT et leur fréquence

$$\text{(brebis castrées traitées)} \quad r = +0,85 \quad P < 0,01$$

$$\text{(brebis cycliques)} \quad r = +0,78 \quad P < 0,01$$

C) Il existe une corrélation positive entre le pourcentage des salves apparaissant sans direction définie et leur fréquence

$$\text{(brebis castrées traitées)} \quad r = +0,59 \quad 0,02 < P < 0,05$$

$$\text{(brebis cycliques)} \quad r = +0,31 \quad 0,10 < P < 0,15$$

2. Chez la Brebis castrée, traitée, éveillée, il en est de même : 61 p. 100 des contractions se propagent dans le sens JUT-cervix et 26 p. 100 dans le sens contraire, à la vitesse de 2,8 cm/s quelque soit le sens. Dans 13 p. 100 des cas, la propagation n'est caractérisée par aucun de ces deux sens.

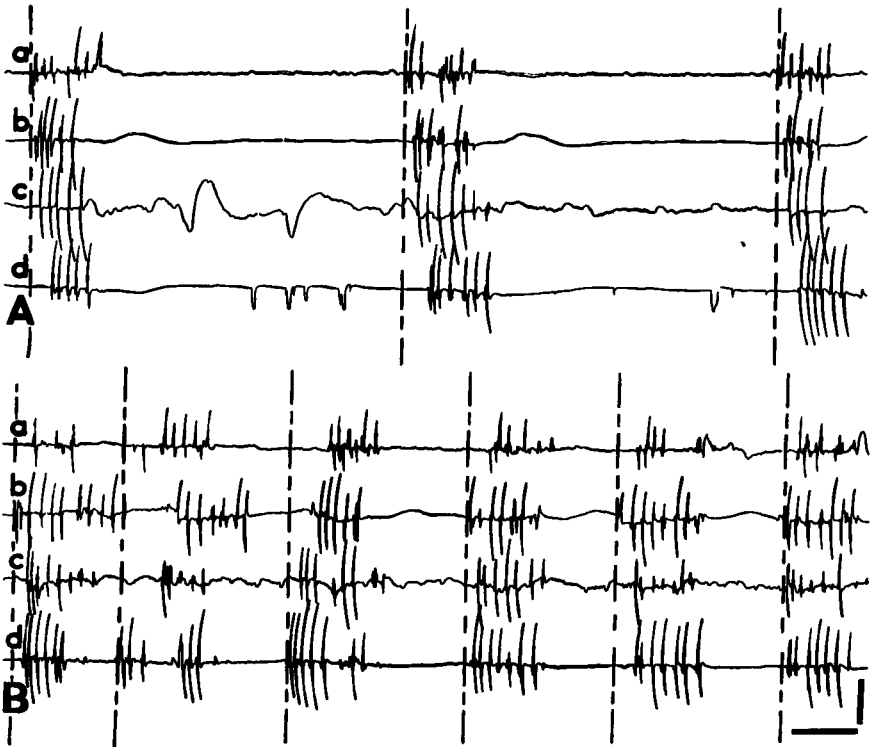


FIG. 5. — Enregistrement de l'activité électrique du myomètre chez une brebis castrée éveillée en œstrus induit, en 4 points d'une même corne utérine :

- a : extrémité de la corne utérine à proximité de la jonction utéro-tubaire,
- b, c : positions intermédiaires,
- d : extrémité cervicale de la corne utérine.

A : la propagation s'effectue de la jonction utéro-tubaire vers le cervix ;

B : période de « forte activité » au cours de laquelle cette propagation n'existe plus ; (ce type de période apparaît spontanément 2 à 3 fois par heure).

Un trait pointillé vertical passant par le début de la salve apparaissant la 1<sup>re</sup> permet d'apprécier l'ordre d'apparition des salves. Des artefacts sont à signaler sur les tracés c et d de la période A.

Étalonnages : amplitude : 500  $\mu$ V

temps : 5 s

L'analyse de périodes d'enregistrement de plus d'une heure met en évidence que :

— La fréquence d'apparition des salves n'est pas constante : elle est en moyenne de 2 salves par mn et elle augmente jusqu'à 5 par mn 2 à 3 fois par heure au cours de périodes qui durent 5 à 8 mn environ (périodes 1, 3 et 5 de la fig. 3 A).

— Il existe une relation entre le sens de propagation des activités et leur fré-

quence (fig. 4). Les corrélations entre la fréquence des salves et leur direction sont respectivement égales à :

- 0,82 ( $P < 0,01$ ) pour la propagation dans le sens JUT-cervix,
- + 0,85 ( $P < 0,01$ ) pour la propagation dans le sens cervix-JUT,
- et + 0,59 ( $0,02 < P < 0,05$ ) pour l'absence de direction définie.

Nous pouvons ainsi définir l'organisation de la motricité le long des cornes utérines. Lorsque la fréquence des salves reste faible, aux environs de 1 à 2 par mn

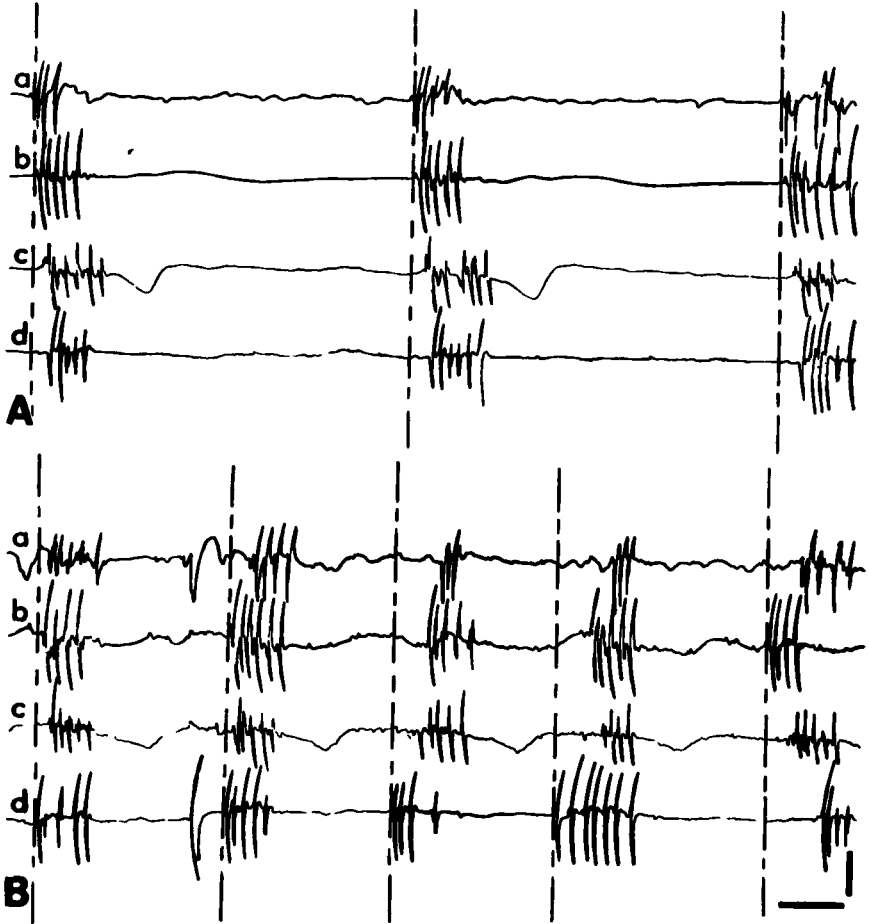


FIG. 6. — Enregistrement de l'activité électrique du myomètre chez une brebis cyclique, éveillée, au cours de l'œstrus en 4 points d'une même corne utérine :

- a : extrémité de la corne utérine à proximité de la jonction utéro-tubaire,
- b, c : position: intermédiaires,
- d : extrémité cervicale de la corne utérine.

A : la propagation s'effectue de la jonction utéro-tubaire vers le cervix ;

B : période de « forte activité » au cours de laquelle cette propagation n'existe plus ; (ce type de période apparaît spontanément 2 à 3 fois par heure).

Un trait pointillé vertical passant par le début de la salve apparaissant la 1<sup>re</sup> permet d'apprécier l'ordre d'apparition des salves. Des artefacts sont à signaler sur les tracés a et d de la période B.

Étalonnages : amplitude : 500  $\mu$ V

temps : 5 s



(périodes 2 et 4 de la fig. 3 A et fig. 5 A), l'activité électrique se propage principalement de la jonction utéro-tubaire vers le cervix. Lorsque la fréquence des salves augmente jusqu'à 4 à 5 par mn (périodes 1, 3 et 5 de la fig. 3 A et fig. 5 B), l'activité électrique se propage alors principalement du cervix vers la jonction utéro-tubaire, ou bien on n'observe pas une direction de propagation bien définie.

3. *Chez la Brebis cyclique*, ce que l'on observe est qualitativement semblable à ce que nous venons de décrire chez la Brebis castrée traitée. On note cependant un certain nombre de différences d'ordre quantitatif concernant la direction et la vitesse de propagation des contractions, les corrélations entre la fréquence des salves et les différents sens de propagation. Les contractions se propagent dans le sens JUT-cervix (fig. 6 A) à la vitesse moyenne de 4,52 cm/s (tabl. 2) dans 59 p. 100 des cas (tabl. 1). Pour 16 p. 100 des activités la propagation se fait dans le sens cervix-JUT (tabl. 1) à la vitesse moyenne de 3,18 cm/s (tabl. 2). 25 p. 100 des activités ne permettent pas de définir une organisation de la propagation dans l'un ou l'autre sens. Par ailleurs, la fréquence des salves n'est pas constante au cours du temps (fig. 3 B et fig. 6). Comme chez la Brebis castrée traitée, l'activité électrique se propage principalement de la jonction utéro-tubaire vers le cervix lorsque la fréquence des salves est faible ; le sens de propagation cervix-JUT devient prépondérant lorsque la fréquence des salves augmente (fig. 4). Les corrélations entre la fréquence des salves et leur direction sont en effet respectivement égales à : — 0,68 ( $P < 0,01$ ) pour le sens JUT-cervix ; + 0,78 ( $P < 0,01$ ) pour le sens cervix-JUT ; le pourcentage des contractions apparaissant sans direction définie a également tendance à augmenter avec la fréquence des salves ; mais la corrélation plus faible, égale à + 0,31, n'est pas significative ( $0,10 < P < 0,15$ ).

## DISCUSSION

L'enregistrement de l'EMG du myomètre en 3 ou 4 points de l'utérus nous permet de faire une analyse précise de l'organisation de la motricité le long des cornes utérines. Il ressort de notre étude qu'en période d'activité normale (2 salves par mn) la propagation se fait surtout dans la direction JUT-cervix et que le sens de propagation des contractions utérines dépend de leur fréquence. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus antérieurement par MANN, 1969 ; BRINSFIELD et HAWK, 1969 ; HAWK, 1970, 1973, 1975 ; WARREN et HAWK, 1971 ; CROKER et SHELTON, 1973. En se référant à ces études, on a admis l'idée classique qu'il existe en sens privilégié des contractions utérines du cervix vers la jonction utéro-tubaire facilitant la remontée des spermatozoïdes à l'intérieur de l'utérus. Les différences entre ces résultats et les nôtres sont vraisemblablement dues aux techniques utilisées. Nous pensons plutôt que, plusieurs fois par heure, les contractions utérines « réactivent » le transit des spermatozoïdes pendant les périodes de forte activité, au cours desquelles la propagation des contractions est inversée et se fait de façon privilégiée du cervix vers la jonction utéro-tubaire. Or nous avons constaté que la distension vaginale pendant l'œstrus provoque une augmentation transitoire de la fréquence des salves de 2 à 6 par minute (ROUSSEAU et PRUD'HOMME, 1974). On peut supposer que le coït ou l'insémination artificielle aurait pour effet, en augmentant l'activité utérine, d'induire des contractions qui, se propageant principalement dans le sens ascendant,

sont propices à amorcer la remontée des spermatozoïdes ou de déclencher des mouvements localisés de va-et-vient, assurant l'étalement du sperme sur la muqueuse.

Il est possible d'expliquer la variabilité de la fréquence des contractions utérines, chez la Brebis sous imprégnation œstrogénique physiologique ou artificielle, en supposant l'existence chez cet animal de plusieurs pacemakers sur la corne utérine. MARSHALL (1959) a en effet localisé des pacemakers aux extrémités cervicale et ovarienne des cornes de l'utérus, chez la Ratte castrée traitée par les œstrogènes. Le sens de propagation dépendrait alors du pacemaker qui a le rythme le plus rapide. Pour les périodes de faible fréquence (2 salves par mn), la prépondérance d'un pacemaker à l'extrémité ovarienne de la corne, expliquerait que les contractions se propagent principalement de la jonction utéro-tubaire vers le cervix. Pour les périodes de fréquence élevée (4 à 5 salves par mn), le pacemaker ovarien perdrait sa prépondérance, soit au profit d'un pacemaker situé à l'extrémité cervicale de la corne, soit au profit de pacemakers multiples. Dans le 1<sup>er</sup> cas, la prédominance du pacemaker cervical dont le rythme serait plus rapide, expliquerait la propagation dans le sens cervix-JUT et l'augmentation de la fréquence des salves. Dans le 2<sup>e</sup> cas, la pluralité des pacemakers expliquerait l'absence d'organisation. On ignore cependant ce qui active périodiquement le pacemaker cervical.

L'enregistrement de l'EMG en plusieurs points du myomètre nous permet également de déterminer la vitesse de propagation des contractions utérines. Chez les brebis cycliques, la vitesse de propagation descendante (JUT-cervix) est supérieure à la vitesse de propagation ascendante. On peut rapprocher ce résultat de celui de GOTO *et al.* (1959) ; ces auteurs ont observé sur le myomètre de souris gravide que la vitesse de conduction sur une distance variant de 0,05 à 5 mm est plus élevée dans la direction descendante que dans la direction ascendante. Il serait intéressant de savoir si cette différence persiste lors du part et dans quelle mesure elle contribue à l'expulsion du fœtus. Chez les brebis cycliques, la vitesse de propagation est supérieure à celle mesurée dans les conditions chroniques chez les brebis castrées et traitées. Le tableau 2 montre également que les vitesses de propagation dans les deux sens sont identiques chez les brebis traitées par les œstrogènes, que les enregistrements soient réalisés sur l'animal éveillé ou anesthésié. Ces différences tiennent vraisemblablement au fait que les caractéristiques du myomètre chez la Brebis cyclique au cours de l'œstrus ne sont pas rigoureusement reproduites par l'injection d'œstrogènes chez la Brebis castrée. On peut se demander si chez cette dernière, la densité des récepteurs du muscle utérin à l'œstradiol n'est pas diminuée et si toutes les fibres musculaires ont la même aptitude à se contracter. L'anesthésie par l'halothane réduit la vitesse de propagation des contractions : 2 cm/s chez la Brebis castrée, traitée et anesthésiée contre 2,8 cm/s chez la Brebis castrée, traitée et éveillée. Or l'halothane diminue également la fréquence moyenne des salves (ROUSSEAU et PRUD'HOMME, 1974). Il agirait donc non seulement sur l'excitabilité de la fibre musculaire, mais aussi sur la propagation des contractions.

Tous ces résultats ont été obtenus pendant la première partie de l'œstrus (les 15 premières heures), au moment où la fréquence des salves est maximale et varie peu (ROUSSEAU et PRUD'HOMME, 1974). Il reste à préciser si les phénomènes observés sont constants pendant les chaleurs ou s'ils caractérisent une période définie de l'œstrus.

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur J.-P. ROUSSEAU pour les conseils et les commentaires qu'il m'a prodigués au cours de ce travail.

## SUMMARY

ORGANIZATION OF UTERINE ACTIVITY DURING ESTRUS IN THE EWE.  
AN ELECTROMYOGRAPHIC STUDY

The electromyographic activity of the myometrium is recorded and analyzed at 3 or 4 sites in the uterus of castrated ewes treated with estrogen or cycling ewes during estrus.

— About 60 p. 100 of the contractions move from the utero-tubal junction (UTJ) towards the cervix,

— there is a relationship between the direction of the propagation of the contractions and their frequency. During low frequency periods (2 per min), the propagation is mainly from the UTJ to the cervix. During high frequency periods (4 to 5 contractions per min), which occur spontaneously 2 to 3 times an hour, contractions move mainly from cervix to the UTJ or in no specified direction.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BRINSFIELD T. H., HAWK H. W., 1969. Modification in the direction of uterine contractions by IUD in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **18**, 535-537.
- CROKER K. P., SHELTON J. N., 1973. Influence of cycle, progestagen treatment and dose of oestrogen on uterine motility in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **32**, 521-524.
- GOTO M., KURIYAMA H., ABE Y., 1959. Electrophysiology of the pregnant mouse uterus. *J. Physiol. Soc. jap.*, **21**, 880.
- HAWK H. W., 1970. Rapid disruption of sperm transport mechanisms by IUD in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **23**, 139-142.
- HAWK H. W., 1973. Investigations of sperm transport and uterine motility in the ewe. *Colloque de l'INSERM*, 4-7 nov. 73, Vol., **26**, 513-532.
- HAWK H. W., 1975. Hormonal control of changes in the direction of uterine contractions in the oestrus ewe. *Biol. Reprod.*, **12**, 423-430.
- HAWK H. W., ECHTERNKAMP S. E., 1973. Uterine contractions in the ewe during progestagen regulated oestrus. *J. Reprod. Fert.*, **34**, 347-349.
- MANN L. I., 1969. Effect of the IUCD on uterine motility in the ewe. *Fert. Steril.*, **20**, 951-958.
- MARSHALL J. M., 1959. Effects of oestrogen and progesterone on single uterine muscle fibers in the rat. *Amer. J. Physiol.*, **197**, 935-942.
- MOORE N. W., BARRET S., BROWN I. B., SCHINDLER I., SMITH M. A., SMITH B., 1969. Oestrogen and progesterone content of ovarian vein blood of the ewe during the oestrus cycle. *J. Endocr.*, **44**, 55-62.
- ROUSSEAU J.-P., PRUD'HOMME M.-J., 1974. Étude électromyographique de la motricité de l'utérus chez la Brebis. Action des hormones. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **14**, 67-85.
- WARREN J. E., HAWK H. W., 1971. Effect of the IUD on sperm transport and uterine motility in sheep and rabbits. *J. Reprod. Fert.*, **26**, 419-422.