Induction de Décharges Gonadotropes Hypophysaires Chez la Carpe (*Cyprinus carpio* L.) à l'Aide du Citrates de Clomiphène

BERNARD BRETON, BERNARD JALABERT, ET ALEXIS FOSTIER
AVEC LA COLLABORATION TECHNIQUE DE MADAME PIERRETTE REINAUD

*Laboratoire de Physiologie des Poissons,
Centre National de Recherches Zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy en Josas, France*

Accepted October 22, 1974

L'injection de citrate de clomiphène (doses de 0.1, 1, et 10 mg/kg en une seule fois) à des Carpes mâles ou femelles, provoque une importante décharge d'hormone gonadotrope plasmatique. La latence et l'amplitude de la réponse croissent avec la dose utilisée. Les résultats les plus constants sont obtenus à la dose de 1 mg/kg, dose à laquelle tous les animaux, quels que soient leur état de maturité et leur sexe, présentent un pic de sécrétion gonadotrope supérieur à 50 ng/ml et d'une durée de 12 hr environ, 56 à 60 hr après l'injection du produit.

Cette décharge est comparable à la décharge gonadotrope ovulante observée chez le Carassin et paraît donc susceptible d'entraîner l'ovulation ou la spermiation chez des poissons choisis au stade de maturité convenable. L'hypothèse d'une compétition du clomiphène et des oestrogènes au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire paraît hautement vraisemblable.

Clomiphene citrate, when given in a single injection to male and female carp at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg, induces a large discharge of gonadotropin into the plasma. The delay and amplitude of the response increase with the dose. The most constant results are obtained with a dose of 1 mg/kg; at this dose, all the animals, whatever their state of maturity and sex, show a plasma gonadotropin peak greater than 50 ng/ml. This peak occurs 56-60 hr after treatment, and lasts about 12 hr.

The discharge can be compared with the ovulatory discharge observed in *Carassius*, and could induce ovulation or spermiation in animals at their optimum state of maturity. It seems likely that clomiphene may act in competition with oestrogens at the hypothalamo-hypophyseal level.

Le citrate de clomiphène analogue structural du chlorotianisène, oestrogène synthétique non stéroïde, exerce des effets oestrogénique ou antioestrogénique chez les mammifères, selon le mode d'administration et la dose (Roy *et al.*, 1963). En particulier il peut induire une élévation des taux de sécrétion de LH et FSH, susceptible de provoquer l'ovulation, chez la femme par exemple.

En fait, l'action peut être très différente selon la dose utilisée chez la femme (Roy *et al.*, 1963), comme chez le rat (Schally *et*

al., 1970), et se traduire soit par une stimulation, soit par un blocage de la sécrétion gonadotrope.

Récemment Pandey et Hoar (1972) ont pu induire l'ovulation par le clomiphène chez *Carassius auratus*, élevé à 13°, température à laquelle elle ne se produit généralement pas. L'hypophyse est indispensable, le clomiphène n'a pas d'effet direct sur la gonade (Pandey, Stacey et Hoar, 1973).

Dans ce travail, nous avons suivi l'évolution du taux de gonadotropine plas-

matique après injection de citrate de clomiphène afin de déterminer la dose susceptible d'entraîner une décharge gonadotrope équivalente à la décharge ovulante telle que nous l'avons décrite chez *Carassius auratus* au cours de la fraie (Breton *et al.*, 1972). Le but est de trouver une technique de substitution à la méthode dite "d'hypophysation" qui consiste à provoquer l'ovulation par injection d'extraits hypophysaires, et dont les limites sont essentiellement la spécificité zoologique importante des hormones gonadotropes chez les poissons téléostéens (Breton, Billard et Jalabert, 1973) et la difficulté d'obtention de matériel en quantité suffisante pour des traitements à grande échelle.

MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation a été réalisée en juin 1973 sur des carpes communes *Cyprinus carpio* L., élevées à 18° sous une photopériode de 12L/12N.

Quatre lots de 20 animaux mâles et femelles ont été constitués; trois lots ont reçu respectivement 0, 1, 1, 10 mg/kg de citrate de clomiphène. Le quatrième lot n'a reçu que le solvant et sert de témoin.

Des prélèvements sanguins de 300 μ l ont été effectués sur tous les animaux, toutes les 4 hr, pendant les 72 hr suivant l'injection. Certains poissons n'ayant pas supporté les prélèvements sanguins rapprochés, nous n'avons tenu compte dans nos résultats que des sujets encore en vie à la fin de l'expérimentation. Le sang prélevé sur héparine a été centrifugé 10 min à 3.000 tours/mn. Les plasmas obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à leur dosage.

A la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés et le rapport gonadosomatique (RGS) déterminé. La détermination du taux d'hormone gonadotrope c-GtH dans les plasma a été réalisée par dosage radioimmunologique selon la technique précédemment décrite (Breton *et al.*, 1971).

RESULTATS

Animaux Témoins

Chez les mâles (Fig. 1A) le taux de base moyen oscille autour de 5 ng/ml. Chez 3

FIG. 1. Evolution du taux de gonadotropine plasmatique chez la Carpe: A. mâles témoins; B. femelles témoins; C. mâles traités par 0.1 mg/kg de clomiphène; D. femelles traitées par 0.1 mg/kg clomiphène.

animaux on constate une augmentation du niveau gonadotrope jusqu'à 20 ng/ml entre 0 et 24 hr, puis un retour au niveau de base. Le nombre d'animaux est trop faible pour que cette élévation ait une signification statistique.

Chez les femelles (Fig. 1B) le taux de base oscille de même autour de 5 ng/ml, que les animaux soient immatures en prévitellogenèse ou en vitellogenèse. Chez un animal on note une élévation du taux de sécrétion entre 20 et 30 ng à la 56^e me heure d'expérience. On ne note pas de périodicité dans le rythme de sécrétion gonadotrope.

Dose 0.1 mg/kg. Chez la plupart des mâles (Fig. 1C) la réponse se produit en 2 temps, le taux de sécrétion gonadotrope s'élève autour de 20 et 25 ng/ml dès 8 hr après l'injection, et une deuxième élévation, plus importante, de l'ordre de 50 ng/ml a lieu entre 20 et 36 hr après le traitement. Sur un animal le clomiphène provoque une succession de décharges de faible amplitude.

Chez les femelles (Fig. 1D) nous n'observons qu'une seule décharge qui ne dépasse pas 50 ng/ml. Cette décharge se produit quel que soit l'état de maturité des animaux et le RGS.

FIG. 2. Evolution du taux de gonadotropine plasmatique chez la Carpe: A. mâles traités par 1 ml/kg de clomiphène; B. femelles traitées par 1 ml/kg de clomiphène; C. mâles traités par 10 ml/kg de clomiphène; D. femelles traitées par 10 ml/kg de clomiphène.

Dose 1 mg/kg. On observe chez les mâles (Fig. 2A) une décharge gonadotrope importante toujours supérieure à 50 ng/ml de plasma, 60 hr après l'injection. Cette décharge se prolonge souvent pendant plus de 12 hr. Chez un animal il a été détecté 2 pics de sécrétion, l'un ponctuel à 32 hr, l'autre prolongé (60-72 hr) comme précédemment.

Chez les femelles (Fig. 2B) dans la plupart des cas, les réponses sont identiques à celles enregistrées chez le mâle. Sept animaux présentent un pic de sécrétion prolongé de 12 hr environ, à partir de la 56^e heure après l'injection; chez deux autres 2 pics se distinguent, l'un ponctuel à 36-40 hr, l'autre identique aux précédents. Comme pour la dose de 0.1 mg/kg la réponse est indifférente du stade de la gamétogenèse.

Dose 10 mg/kg. Pour cette dose 4 mâles sur 6 ne montrent pas de décharge typique de c-GtH, mais une élévation du niveau de sécrétion moyen autour de 10 ng/ml en fin d'expérience (Fig. 2C). Les deux autres présentent soit une décharge importante entre 32 et 40 hr, soit une double stimulation à 28 et 64 hr. La situation est identique chez les femelles (Fig. 2D): deux animaux présentent un pic de sécrétion important 52 et 56 hr après l'injection. Chez les 4 autres, on n'enregistre pas de pic, seulement de faibles décharges de l'ordre de 20 ng/ml entre la 28 et 40^e heure.

DISCUSSION

Il semble que l'on puisse écarter des réponses aberrantes dues au stress; seul un animal témoin femelle présentant une décharge comprise entre 20 et 30 ng/ml à 56 hr. Cette décharge est inférieure à toutes celles enregistrées chez les animaux traités au clomiphène.

Ces résultats précisent ceux de Pandey et Hoar (1972) et de Pandey, Stacey et Hoar (1973). Il est en effet fort probable que les ovulations induites par ces auteurs chez *Carassius auratus* résultent d'une

décharge gonadotrope hypophysaire, telle que nous l'avons mise en évidence dans ce travail, et qu'il s'agit bien d'une action du clomiphène au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire.

Nous n'avons pas dans notre expérience enregistré d'ovulation, les animaux n'étant pas à un stade de maturité ovocytaire suffisamment avancé. Il est cependant important de constater que les décharges se produisent quel que soit l'état de maturité des animaux et particulièrement pour les femelles, qu'elles soient immatures, en prévitellogenèse ou en vitellogenèse.

Il y a lieu de s'interroger sur le fait que la réponse à des doses croissantes de clomiphène: 0.1, 1, 10 mg/kg en une seule injection, présente une latence croissante de 16-20 hr, à 56-60 hr la réponse n'ayant pas encore eu lieu 72 hr après l'injection d'une dose de 10 mg/kg dans la majorité des cas.

Chez la ratte ovariectomisée, Schally *et al.* (1970) ont pu démontrer que des doses de clomiphène de 45 μ g/rat stimulent la sécrétion de LH, alors qu'à 135 μ g et plus, les taux de LH sécrété étaient inférieurs à ceux observés chez des animaux témoins. Plus récemment dans une étude comparative de plusieurs substances anti-oes-trogéniques stéroïdiennes ou non, Black et Kraay (1973) ont démontré que l'inhibition de la liaison de l' $\{H^3\}$ -oestradiol aux récepteurs utérins *in vitro* croissait avec la dose de clomiphène utilisée. Roy *et al.* (1964), Kato *et al.* (1968) avaient déjà mis en évidence ce phénomène au niveau des récepteurs utérins et hypothalamo-hypophysaire *in vivo*. Tous ces travaux aboutissent à l'hypothèse d'une compétition directe du clomiphène avec les oestrogènes au niveau de ces 3 types de récepteurs. Ce même type d'hypothèse peut-être proposé chez la Carpe.

Dans un travail récent (Breton *et al.*, données non publiées) nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un feed back positif de l'oestradiol sur le complexe

hypothalamo-hypophysaire dans cette espèce. En effet l'injection à des Carpes d'oestradiol 17β à la dose 2, 5 mg/kg 3 fois par semaine entraîne une décharge gonadotrope de 24 à 72 hr après la première injection chez les femelles, et 4 à 6 jours après le traitement chez des animaux mâles. Ainsi le clomiphène bloque la sécrétion de gonadotropine hypophysaire, sans doute par compétition avec les oestrogènes et cet effet de blocage est d'autant plus prolongé que la dose est élevée.

Cependant aucune preuve ne nous permet d'affirmer que ce blocage se situe au niveau hypothalamique comme le suggèrent Igarashi *et al.* (1967) et plus particulièrement Schally *et al.* (1970) chez le rat et Kastin *et al.* (1970) chez l'homme, après étude de la décharge de LH sous l'influence de LH/FSH-RH chez les sujets traités au clomiphène.

En conclusion, ces résultats tendent à démontrer que la possibilité d'utiliser le clomiphène pour remplacer les traitements d'hypophysation n'est pas utopique. Il reste que le moment d'intervention devra être déterminé avec précision, ainsi que la dose à utiliser afin d'éviter, soit un blocage probable de la décharge gonadotrope par de trop fortes doses, soit une stimulation excessive à contretemps par rapport à l'état physiologique de maturation sexuelle des animaux traités. Dans l'état actuel de nos travaux, on peut avancer que la dose optimale de clomiphène à injecter en une seule fois et susceptible de provoquer une décharge de gonadotropines importante et constante chez tous les animaux, se situe aux alentours de 1 mg/kg.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les laboratoires Merell-Toraupe pour la fourniture du citrate de clomiphène utilisé dans ce travail, ainsi que l'Institut National de la Recherche Agronomique et la D.G.R.S.T. (contrat n° 7I 7 3026) qui ont supporté ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- Black, L. J., and Kraay, R. J. (1973). Evaluation of two types of oestrogen inhibition with regard to effects on uptake and binding of $\{^3\text{H}\}$ estradiol in the uterus. *J. Steroid Biochem.* **14**, 467-475.
- Breton, B., Kann, G., Burzawa-Gerard, E., and Billard, R. (1971). Dosage radioimmunologique d'une hormone gonadotrope de Carpe (*Cyprinus carpio* L.). *C.R. Acad. Sci.* **272**, 981-983.
- Breton, B., Billard, R., Jalabert, B., and Kann, G. (1972). Dosage radioimmunologique des gonadotropines plasmatiques chez *Carassius auratus* au cours du nyctémère et de l'ovulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **18**, 463-468.
- Breton, B., Billard, R., and Jalabert, B. (1973). Spécificité d'action et relations immunologiques des hormones gonadotropes de quelques Téléostéens. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **13**, 347-362.
- Igarashi, M., Ibuki, Y., Kubo, H., Kamioka, J., Yokota, N., Ebara, Y., and Matsomoto, S. (1967). Mode and site of action of clomiphène. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **97**, 120-123.
- Kastin, A. B., Schally, A. W., Gual, C., Midgley, A. R., Jr., Miller, Mc C., III, and Flores, F. (1970). Increased release of LH after administration of LH-RH to men pretreated with clomiphène. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **31**, 689-692.
- Kato, J., Kobayashi, T., and Vilee, C. A. (1968). Effects of clomiphène on the uptake of estradiol by the anterior hypothalamus and hypophysis. *Endocrinology* **82**, 1049-1052.
- Pandey, S., and Hoar, W. S. (1972). Induction of ovulation in goldfish by clomiphène citrate. *Can. J. Zool.* **50**, 1679-1680.
- Pandey, S., Stacey, N., and Hoar, W. S. (1973). Mode of action of clomiphène citrate in inducing ovulation in goldfish. *Can. J. Zool.* **51**, 1315-1316.
- Roy, S., Greenblatt, R. B., Mahesh, V. B., and Jungck, E. C. (1963). Clomiphène citrate: Further observations on its use in induction of ovulation in the human and on its mode of action. *Fert. Steril.* **14**, 575-595.
- Roy, S., Greenblatt, R. B., and Mahesh, V. B. (1964). Effects of clomiphène on the physiology of reproduction in the rat. II. Its oestrogenic and anti-oestrogenic actions. *Acta Endocrinol.* **47**, 657-668.
- Schally, A. V., Carter, W. H., Parlow, A. F., Saito, M., Arimura, A., Bowers, C. Y., and Holtkamp, D. E., 1970. Alteration of LH and FSH release in rats treated with clomiphène or its isomers. *Amer. J. Obstet.* **107**, 1156-1167.