

Cas de nécrose cutanée chez des grenouilles africaines à griffes *Xenopus laevis* suite à une application topique d'eugénol

Andréanne Ross, Sarah Annie Guénette, Pierre Hélie, Pascal Vachon

Résumé – Des grenouilles africaines à griffes ont démontré des concentrations élevées des lésions nécrotiques cutanées suite à une administration topique d'eugénol (agent analgésique et anesthésique). Au microscope, une ulcération de l'épiderme avec une perte des glandes muqueuses et séreuses ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires ont été observées.

Abstract – **Case of cutaneous necrosis in African Clawed frogs *Xenopus laevis* after the topical application of eugenol.** African Clawed frogs showed necrotic cutaneous lesions after a topical application of high concentrations of eugenol, an analgesic and anesthetic agent. Microscopically, ulceration of the epidermis, a loss of mucous and serous glands as well as an infiltration of inflammatory cells were observed.

(Translated by Isabelle Vallières)

Can Vet J 2006;47:1115–1117

Les effets analgésique et anesthésique de l'eugénol, un extrait du clou de girofle (*Eugenia aromatica*), ont été évalués chez des grenouilles africaines à griffes (*Xenopus laevis*) femelles (*Xenopus* I, Dexter, MI). Des propriétés anesthésiques de l'huile de clou de girofle ont précédemment été démontrées chez des grenouilles léopard *Rana pipiens* (1). Les grenouilles étaient logées dans des cages remplies d'eau (> 4L/grenouille) traitées aux rayons ultraviolets et au charbon activé. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité institutionnel de protection des animaux de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal et il est en accord avec les lignes directrices du Conseil canadien pour la protection des animaux (CCPA).

Dans un premier temps, 21 grenouilles ont été utilisées. Différentes voies d'administration (sous-cutanée, intrapéritonéale, intracœlomique) ont d'abord été testées avec des doses croissantes d'eugénol en laissant des intervalles de deux semaines entre chaque évaluation des différentes voies d'administration. Aucune combinaison n'a produit d'anesthésie ni d'effet toxique chez les animaux. Il a alors été décidé de tester l'administration topique (2) chez 21 nouvelles grenouilles. Pour ceci, chaque grenouille était maintenue hors de l'eau et une gaze imbibée d'une solution constituée de propylène glycol (volume 60 %), de saline 0,9 % (volume 40 %) et d'eugénol (99 % pur; densité 1,066 g/mL; Sigma Inc., St-Louis, Missouri, États-Unis) était placée sur le dos pour une durée de 5 min. Des concentrations croissantes d'eugénol (0, 5, 10, 20, 40, 60 et 100 mg/mL) ont été éva-



Figure 1. Lésions macroscopiques chez *Xenopus laevis*, montrant la zone nécrosée suite à l'application topique d'eugénol.

luées sans atteindre un niveau anesthésique (3 grenouilles/concentration). Suite à l'application de la gaze, les grenouilles étaient rincées à l'eau et évaluées pour le niveau d'analgésie et d'anesthésie. Les grenouilles ayant reçu des doses de 60 et 100 mg/mL présentaient d'importants foyers de nécroses cutanées (Figure 1) le lendemain des expériences. Vingt-quatre heures après l'administration d'eugénol les grenouilles ont été sacrifiées (anesthésie à l'eugénol et décérébration). La peau dorsale des grenouilles 0, 60 et 100 mg/mL a été prélevée et envoyée pour des examens histopathologiques. L'évaluation de l'anesthésie et de l'analgésie par immersion dans un bain d'eau contenant de l'eugénol en solution a aussi été réalisée chez des grenouilles *Xenopus laevis* ($n = 6$). L'administration par voie transcutanée et en concentration faible (350 mg/L d'eau) a favorisé une meilleure absorption sans toxicité cutanée. Une durée d'anesthésie d'une heure a été obtenue chez la plupart des

Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, Départements de biomédecine vétérinaire, de pathologie et de microbiologie, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 7C6.

Adresser toute correspondance au Dr. Pascal Vachon; e-mail: pascal.vachon@umontreal.ca

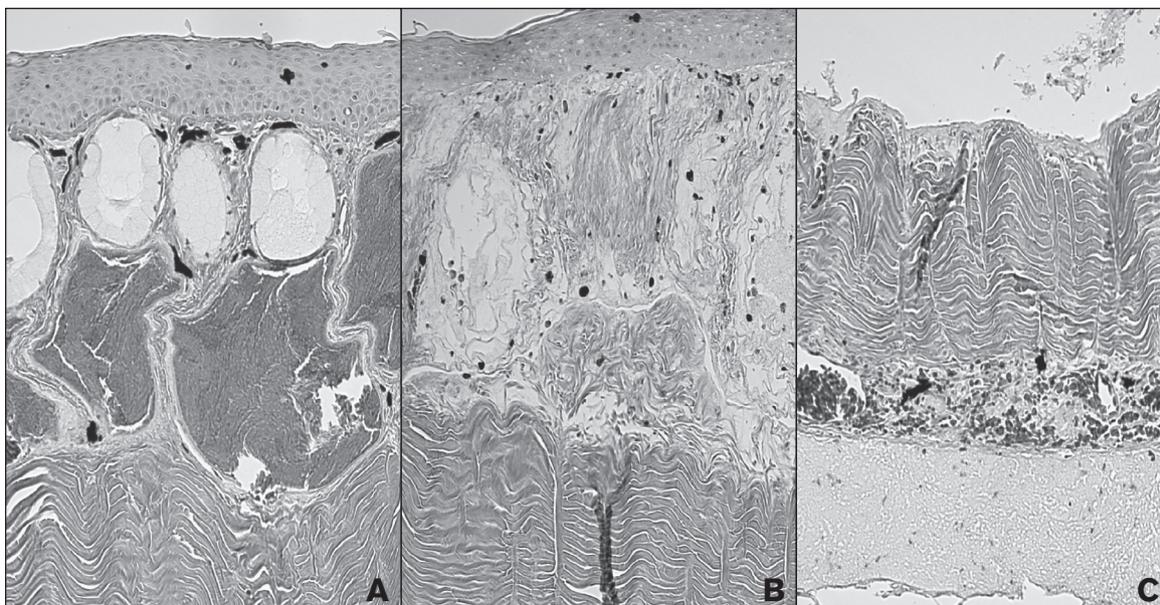


Figure 2. Sections histologiques montrant de la peau normale (A) et la nécrose cutanée (B,C) suite à l'administration topique de l'eugénol à doses élevées. **A :** Peau et glandes muqueuses et séreuses normales. **B :** Zone périphérique de la lésion et glande muqueuses et séreuses vidées. **C :** Perte de l'épiderme, des glandes et infiltration leucocytaire avec érythème.

grenouilles sans causer des lésions tissulaires (peau, foie, rein) (soumis pour publication).

L'histopathologie montre : une désorganisation des couches cellulaires, de la nécrose et une ulcération de l'épiderme, une dégénérescence des glandes cutanées ainsi qu'une infiltration des cellules inflammatoires. De telles lésions peuvent être caractéristiques d'une irritation cutanée causée par la toxicité de l'eugénol, une hypoxie cellulaire suite au manque d'échange d'oxygène ou par une vasoconstriction cutanée. Il y a donc eu vidange puis destruction des glandes au niveau de la zone nécrosée et une nette augmentation de mucus sur le reste du corps a été notée. Les glandes muqueuses des amphibiens sécrètent une couche gluante protectrice qui prévient des dommages chimiques, facilite la rétention des fluides corporels et fournit une barrière contre des pathogènes (3). Il serait donc probable qu'en réponse à l'eugénol topique, il y ait eu stimulation de la sécrétion de mucus par les glandes muqueuses.

Puisque l'eugénol est un dérivé du phénol [2-méthoxy-4-(2-propenyl) phénol], il est possible que la nécrose cutanée ait pu survenir suite à l'action de la fonction phénolique (4). L'eugénol à forte dose est irritant pour les yeux et la peau (4). Plusieurs effets de la toxicité reliée au phénol sont connus, tant au niveau local que systémique. D'ailleurs, le phénol exerce une action corrosive marquée, sur tout tissu mis en contact lors d'ingestion, d'inhalation ou après une exposition de la peau (5) et des membranes muqueuses (6,7). L'effet inflammatoire et nécrotique de l'application de phénol sur la peau est d'autant plus marqué lorsque le site d'application est couvert d'un bandage (8). Le phénol étant un anesthésique local, ceci expliquerait pourquoi aucune douleur n'est perçue lors de l'application. Ainsi le délai de perception de la douleur peut être suffisant pour causer des brûlures sérieuses et favoriser une absorption importante à travers la peau (9). Le caractère lipophilique du phénol explique

son absorption cellulaire rapide pouvant conduire à un empoisonnement systémique (10). La toxicité des phénols concorde avec la destruction tissulaire à des concentrations supérieures à 60 mg/mL uniquement et nos résultats confirment donc que l'eugénol est probablement associé aux lésions tissulaires. Cela élimine donc la possibilité que la gaze ayant des concentrations plus faibles d'eugénol (entre 0 et 60 mg/mL) ait pu avoir un effet toxique ou inhibiteur sur la respiration cutanée. Parallèlement, ces concentrations topiques élevées peuvent aussi expliquer l'absence d'anesthésie. Les composés phénolés sont des anesthésiques locaux mais, à des concentrations se situant entre 5 et 10 %, le phénol dénature les protéines de l'épiderme, ce qui peut en partie prévenir l'absorption (5, 8), donc l'effet anesthésique. Le phénol est d'ailleurs connu pour sa perturbation des ponts disulfures de la kératine de la peau (10). Des études *in vitro* ont montré la formation par les neutrophiles et les leucocytes activés de métabolites réactifs dommageables. Des tests *in vivo* et *in vitro* ont aussi montré les liaisons covalentes du phénol et de ses métabolites avec le tissu et les protéines plasmatiques (8), ce qui produit de la nécrose de coagulation.

Donc l'application d'eugénol directement sur la peau des grenouilles à des concentrations élevées (> 60 mg/mL) a causé les effets cytotoxiques. La période d'exposition ainsi que la concentration du phénol sont deux facteurs déterminant l'étendue de l'absorption mais c'est l'aire d'exposition qui affecte davantage l'absorption (5), ce qui explique bien les différents niveaux d'anesthésie obtenus entre l'administration topique et l'immersion. Ce rapport de cas sur la nécrose cutanée chez *Xenopus laevis* suite à l'administration topique d'eugénol à forte concentration se veut une mise en garde par rapport à sa toxicité potentielle.

CVJ

Références

1. LAFORTUNE, M., M. MITCHELL et J.A. SMITH. «Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*», *J Herpet Med Surg*, 2001, vol.11, n° 4, p. 13–18.
2. SMITH, M.S. et K.C. STUMP. «Isoflurane anesthesia in African Clawed Frogs (*Xenopus leavis*)», *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2000, vol. 39, n° 6, p. 39–42.
3. O'ROURKE, D.P. et T.W. SCHULTZ. «Biology and disease of amphibians», in FOX, J.G., J.C. ANDERSON, F.M. LOEWet F.W. QUIMBY, éd. *Laboratory Animal Medicine*, 2^e éd., Orlando, Academic Pr., 2002, p. 801–803.
4. *Safety (MSDS) data for eugenol*, Physical and Theoretical Chemistry Laboratory, Oxford University. Chemical and Other Safety Information, 2003. Disponible au : <http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/EU/eugenol.html> Dernière consultation : 5/25/2005.
5. IPCS INCHEM. *International Program on Chemical Safety, Poisons Information*. Monograph 412 Chemical, 1998. Disponible au : <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim412.htm> Dernière consultation : 5/25/2005.
6. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). *Toxicological Profile for Phenol*. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta (GA), 1989.
7. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. *Hazardous Substances Data Bank (HSDB online database)*. National Toxicology Information Program, National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda (MD), 1993.
8. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. *IPCS Environmental Health Criteria for Phenol* (161), première ébauche rédigée par G. K. Montizan, publiée par l'OMS, Finlande, 1994.
9. LYONS, G., M. HANNANT, C. FLETCHER, L. CATTERICK, J. HALSEY. et C. NEWHAM, «C Chemical Safety Data Sheet, Volume 4b (m-z)» in ALLEN, R., éd., *Toxic Chemicals*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991.
10. BROOKS, J.D. et J.E. RIVIERE. «Quantitative percutaneous absorption and cutaneous distribution of binary mixture of phenol and par-nitrophenol in isolates perfused porcine skin», *Fundam Appl Toxicol* 1996, vol. 32, p. 233–243.

Book Review Compte rendu de livre

Veterinary Epidemiology, 3rd ed.

Thrusfield M. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, 2005, ISBN 0-632-06397-1. US\$159.99.

The 3rd edition of Thrusfield's *Veterinary Epidemiology* maintains the strengths of previous editions. It continues to have a rich array of tables and figures, and provides relevant examples that should give veterinary students the necessary context to appreciate epidemiological concepts. Additional material has been added to several chapters, and a number of new examples and current references have been included. The reorganization of material into explicit sections such as causality in Chapter 3, and surveillance in Chapter 10, improves the overall text. This edition, however, could also have been improved with the deletion of some dated material, and the reorganization of chapters to follow a more logical thematic sequence. For instance, an excellent section on infectious disease modeling in Chapter 19 is supported by basic material on disease transmission and maintenance in Chapter 6, and almost 200 pages separate a wonderful chapter on causality from an introduction to basic measures of association. Thrusfield often indicates where supporting material may be found in subsequent and preceding chapters, but dividing chapters along thematic lines would have made this textbook more effective pedagogically.

Although large portions of text and many figures and tables remain unchanged between the 2nd and 3rd editions, Thrusfield has updated examples and references, and added some new material. There is a new section on participatory epidemiology (Chapter 10) and bootstrap estimation (Chapter 12). Thrusfield has also made effective use of the 2001 foot-and-mouth disease

epidemic in the United Kingdom to exemplify a number of concepts. Footnotes provide historical context, identify controversies, and explain the etymology of epidemiological terms. Although not always necessary, these footnotes are often interesting and enhance this edition.

Perhaps the greatest oversight in this edition is the presence of dated material. The chapter on data collection and management (Chapter 11) still discusses outdated recording methods, and includes an introduction to computer technology that is no longer necessary for the intended audience. The presentation of hand calculations for a variety of statistical tests is appreciated, but these calculations should be placed in the appendices, and the text should focus on the interpretation of results and statistical assumptions for performing these tests. Readily available statistical software also precludes the need for so many statistical tables in the appendices.

Veterinary Epidemiology continues to be a useful introduction to a broad range of topics in epidemiology, and should be considered when developing a reading list for an introductory course in epidemiology. Thrusfield's textbook effectively introduces students to major areas of epidemiology including diagnostic testing, disease modeling, clinical trials and meta-analysis, observational studies, surveillance, and disease control and eradication. I have found it particularly useful for preparing introductory lectures on infectious disease modeling and descriptive epidemiology.

Reviewed by **David L. Pearl, BSc, DVM, MSc, PhD**, Assistant Professor, Department of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1.