



Université de Montréal

EFFICACITÉ ET TOXICITÉ DE L'EUGÉNOL ADMINISTRÉ À DES DOSES  
ANESTHÉSIANTES CHEZ DES GRENOUILLES *XENOPUS LAEVIS*.

par FÉLIX GOULET

Département de biomédecine vétérinaire  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de  
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires option médecine des animaux de laboratoire

Août 2012

©Félix Goulet, 2012

## Résumé

L'eugénol permet d'induire une anesthésie chirurgicale chez la grenouille africaine à griffes (*Xenopus laevis*) sans causer de lésions chez des grosses grenouilles (90-140g). Le premier objectif de la présente étude était de déterminer la durée de l'anesthésie et d'évaluer la dépression du système nerveux central ainsi que les changements de saturation en oxygène et de fréquence cardiaque chez des petites ( $7.5 \pm 2.1$  g) et moyennes ( $29.2 \pm 7.4$  g) grenouilles *Xenopus laevis* en fonction du temps d'exposition à un bain d'eugénol de  $350 \mu\text{L/L}$ . Suite à une immersion de 5 ou 10 minutes, la réponse au test à l'acide acétique, au réflexe de retrait et au réflexe de retournement était absente pendant 1 heure (petites grenouilles) et 0,5 heure (moyennes) et l'anesthésie chirurgicale durait au maximum 15 et 30 minutes chez les petites et moyennes grenouilles respectivement. La saturation en oxygène n'était pas affectée de façon significative, mais la fréquence cardiaque était diminuée jusqu'à 1 heure post-immersion dans les deux groupes. Le deuxième objectif était de déterminer la toxicité de l'eugénol chez des grenouilles de taille moyenne après une ou trois administrations à une dose anesthésique, avec ou sans période de récupération d'une semaine. Histologiquement, il y avait de l'apoptose tubulaire rénale et des membranes hyalines pulmonaires après une administration, et de la nécrose hépatique et des hémorragies dans les tissus adipeux après trois administrations. Ces résultats suggèrent que le poids corporel est un paramètre important à considérer lors de l'anesthésie de grenouilles *Xenopus laevis* par immersion dans l'eugénol.

**Mots-clés** : eugénol, huile de clou de girofle, *Xenopus laevis*, grenouille africaine à griffes, amphibien, anesthésie, poids corporel, toxicité.

## **Abstract**

Eugenol has been shown to induce surgical anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) without causing lesions after a single administration in large frogs (90-140g). The first objective of this study was to determine the duration of anesthesia in small ( $7.5 \pm 2.1$  g) and medium ( $29.2 \pm 7.4$  g) *Xenopus laevis* frogs and evaluate CNS depression and changes in oxygen saturation and heart rate relative to exposure time in a eugenol bath (350  $\mu$ L/L). After immersion for 5 or 10 minutes, no responses to the acetic acid test (AAT), withdrawal reflex, and righting reflex were seen for 1 h (small frogs) or 0.5 h (medium frogs), and small and medium frogs were under surgical anesthesia for a maximum of 15 and 30 minutes respectively. Oxygen saturation was not significantly affected by anesthesia, but heart rate was depressed for as long as 1 hour post-exposure in both groups of frogs. The second objective was to determine the toxicity of eugenol in medium frogs after one or three administrations at anesthetic doses, with or without a 1 week recovery period. Histopathology revealed renal tubular apoptosis and pulmonary hyaline membranes after 1 administration, as well as hepatic necrosis and adipose tissue hemorrhages after 3 administrations. These results suggest that body weight is an important parameter to consider when using a eugenol bath for anesthesia of *Xenopus laevis* frogs.

**Keywords** : eugenol, clove oil, *Xenopus laevis*, african clawed frog, amphibian, anesthesia, body weight, toxicity.

## Table des matières

Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	3
La grenouille africaine à griffes ( <i>Xenopus laevis</i> ) .....	3
Caractéristiques biologiques importantes .....	3
Utilisation en recherche.....	4
L'anesthésie des amphibiens.....	7
La douleur chez les amphibiens .....	7
Examen pré-anesthésique, suivi de l'anesthésie et période de réveil.....	8
Voies d'administration de médicaments anesthésiques .....	13
Drogues anesthésiques utilisées chez les amphibiens .....	18
Toxicité de l'eugénol et du clou de girofle .....	27
Toxicité par ingestion.....	27
Toxicité par injection intraveineuse .....	29
Toxicité par application topique.....	30
Toxicité par inhalation .....	30
Réactions allergiques .....	31
Articles .....	33
Article 1: Eugenol Anesthesia in African Clawed Frogs ( <i>Xenopus laevis</i> ) of Different Body Weights.....	34
Article 2: Evaluation of the toxicity of eugenol at anesthetic doses in African clawed frogs ( <i>Xenopus laevis</i> ).....	47
Efficacité anesthésique de l'eugénol.....	71
Toxicité de l'eugénol.....	74
Conclusion .....	79
Sources documentaires.....	80

## Liste des tableaux

### Dans la recension de la littérature

Tableau I : Classification phylogénétique de la grenouille africaine à griffes.....p.3

### Dans le deuxième article

Table I: Summary of histologic lesions associated with single or repeated eugenol administrations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*).....p.55

## Liste des figures

### Dans la recension de la littérature

- Figure 1. Structure chimique de l'eugénol.....p.1  
 Figure 2. Grenouilles *Xenopus laevis* immergées dans une solution aqueuse d'eugénol..p.14

### Dans le premier article

- Figure 1. Percentage of *Xenopus laevis* frogs that responded to the acid acetic test (AAT), withdrawal reflex (WR), and righting response (RR) as a function of time and different exposure times to a eugenol bath (350 µL/L).....p.40  
 Figure 2. Heart rate (mean ± SE) before and after immersion of small and medium *Xenopus laevis* frogs ( $n = 5$  per group) in a solution of eugenol (350 µL/L).....p.41  
 Figure 3. Oxygen saturation (mean ± SE) measured with a pulse oximeter before and after immersion of small and medium *Xenopus laevis* frogs ( $n = 5$ /group) in a solution of eugenol (350 µL/L.).....p.41

### Dans le deuxième article

- Figure 1. Renal tubular apoptosis in *Xenopus laevis* that received a single eugenol administration and was sacrificed twenty-four hours after exposure.....p.56  
 Figure 2A. Renal tubular regeneration in *Xenopus laevis* that received a single eugenol administration and had one week of recovery period.....p.57  
 Figure 2B. Higher magnification of Fig 2A.....p.57  
 Figure 3. Pulmonary hyaline membranes from *Xenopus laevis* that received a single eugenol administration and had one week of recovery prior to euthanasia.....p.58  
 Figure 4. Massive hepatic necrosis from *Xenopus laevis* that received 3 consecutive daily eugenol administrations and was sacrificed at 24 hr after last administration.....p.59

## Liste des sigles et abréviations

### **Dans la recension de la littérature :**

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ALT : Alanine Aminotransférase

ARN : Acide Ribonucléique

AST: Aspartate Aminotransférase

FETAX : Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus

MS-222: Méthanesulfonate de Tricaine

NMDA: N-Méthyl-D-Aspartate

### **Dans le premier article :**

AA : Acetic Acid

AAT : Acetic Acid Test

BPM: Beats Per Minute

CNS : Central Nervous System

GABA: Gamma-Aminobutyric Acid

PVC : Polyvinyl Chloride

RR: Righting Response

TRPV1 : Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1

UV : Ultraviolet

WR : Withdrawal Reflex

### **Dans le deuxième article :**

HEPS : Hematoxylin, eosin, phloxin and saffron

PVC : Polyvinyl chloride

UV : Ultraviolet

### **Dans la discussion :**

PCR : Polymerase Chain Reaction

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

## **Remerciements**

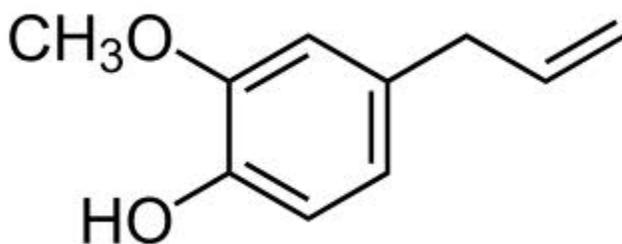
Merci à Dr Pascal Vachon et à Dr Pierre Hélie de m'avoir confié ce projet et de m'avoir soutenu dans sa réalisation. Merci pour votre dévouement et vos connaissances. Merci surtout pour votre très grande patience!

Merci à Dre Monique Doré et Dre Christiane Girard d'avoir pris le temps d'évaluer ce mémoire. Merci aussi pour vos enseignements durant la résidence en pathologie.

Merci à Marie-Thérèse Parent, Jacinthe Cardin, Josée Letellier, Nancy Veilleux, Louise Cossette, Maria Paula Colas Ramirez, Marco Langlois et Nathalie Therrien pour leur précieuse aide technique.

## Introduction

L'eugénol (1-allyl-3-méthoxy-4-hydroxybenzène) est un composé phénolique qui est l'ingrédient actif principal de l'huile extraite du clou de girofle (Figure 1). Le clou de girofle est en fait le bouton floral séché du giroflier (*Syzygium aromaticum*, aussi appelé *Eugenia caryophyllata*), un arbre originaire d'Asie du Sud-Est et appartenant à la famille des Myrtaceae; l'huile essentielle qui en est extraite contient environ 88% d'eugénol [1]. Couramment utilisé comme additif alimentaire, l'eugénol est aussi utilisé depuis le 17<sup>ième</sup> siècle comme anesthésique local par les dentistes [2]. Au cours des siècles, on a attribué de nombreuses vertus au clou de girofle : celui-ci a été utilisé pour rafraîchir l'haleine, réchauffer le corps, éloigner les esprits, stimuler l'appétit, prévenir le mal de mer et traiter la goutte [3]. Dans la médecine traditionnelle africaine, il est utilisé pour préparer des décoctions pour traiter divers troubles, principalement des désordres gastro-intestinaux [4].



**Figure 1.** Structure chimique de l'eugénol.

Le potentiel anesthésique de l'huile de clou de girofle a été démontré chez de nombreuses espèces de poissons et crustacés pour réduire le stress du transport ou lors de procédures expérimentales ou diagnostiques [5-12]. L'huile de clou de girofle et l'eugénol sont aussi efficaces pour l'anesthésie de différentes espèces amphibiennes comme la grenouille léopard (*Rana pipiens*), la grenouille africaine à griffes (*Xenopus laevis*) et la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*) [13-15].

Chez la grenouille *Xenopus laevis*, l'eugénol a été administré par immersion dans une solution aqueuse de 350mg/L pendant 15 minutes chez des femelles de 90 à 140g. Ceci a

produit une anesthésie chirurgicale d'au moins 30 minutes chez la plupart des sujets avec un temps d'induction court (15 minutes). De plus, l'eugénol semble sécuritaire puisque les animaux étaient en santé le jour suivant et il n'y avait pas de lésions histologiques reliées à l'eugénol dans le foie, les poumons, les reins, le cœur et les yeux [14]. L'immersion dans une solution d'huile de clou de girofle a aussi été efficace pour induire l'anesthésie chirurgicale chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*) et la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*) [13, 15].

L'eugénol semble donc être une substance prometteuse pour l'anesthésie des amphibiens. Cette substance naturelle, peu coûteuse et facilement accessible produit un niveau d'anesthésie adéquat avec des temps d'induction et de réveil relativement courts lorsqu'administrée par immersion. Cependant, nous avons peu de données concernant les effets de l'eugénol chez des grenouilles de poids corporels variables et lors d'administrations multiples. Dans notre premier article [16], nous comparons l'effet de l'eugénol sur des grenouilles de différents poids corporels en fonction du temps d'exposition : nous déterminons la durée de l'anesthésie, l'effet sur le système nerveux central et la fonction cardiaque et respiratoire chez des petites et moyennes grenouilles pour ensuite comparer ces résultats à ceux obtenus dans une étude précédente avec des grosses grenouilles. Pour ce faire, les paramètres utilisés sont le test à l'acide acétique, le réflexe de retrait, le réflexe de retournement, la fréquence cardiaque, la saturation en oxygène et la réponse à une incision chirurgicale. Dans le deuxième article [17], nous évaluons la toxicité de l'eugénol sur des grenouilles de taille moyenne après une ou trois administrations à une dose anesthésique, avec ou sans période de récupération. L'histopathologie est effectuée sur tous les tissus prélevés en nécropsie pour détecter les lésions reliées à l'eugénol.

## Recension de la littérature

### La grenouille africaine à griffes (*Xenopus laevis*)

#### Caractéristiques biologiques importantes

Les grenouilles *Xenopus laevis*, aussi appelées grenouilles africaines à griffes, sont originaires d'un vaste territoire s'étendant de l'Afrique du Sud jusqu'au Soudan et au Nigéria. La première description de cette espèce est attribuée au naturaliste et zoologiste français François Marie Daudin, qui a nommé cette espèce *Bufo laevis* en 1802, ce qui signifie crapaud lisse, en référence à la peau lisse de ces animaux. Puisqu'en réalité cette espèce différait des crapauds et des grenouilles jusque là connus, cet amphibien a plus tard été classifié dans une espèce nouvellement créée : *Xenopus laevis*. Le terme *Xenopus* signifie « pattes étranges », en raison des pattes postérieures palmées à 5 orteils dont 3 possèdent de petites griffes noires leur permettant de creuser ou de déchiqueter de la nourriture. Ces amphibiens appartiennent à l'ordre des anoures, qui sont des amphibiens sans queue, au même titre que la plupart des grenouilles (ranidae) et crapauds (bufonidae) les plus connus. Ces grenouilles appartiennent par ailleurs à la famille des pipidae qui sont dépourvus de langue (Tableau I) [18].

Tableau I : Classification phylogénétique de la grenouille africaine à griffes

Règne	Animal
Embranchement	Chordés
Classe	Amphibiens
Ordre	Anoures
Famille	Pipidae
Sous-famille	Xenopidinae
Genre	Xenopus
Espèce	Laevis

Les grenouilles *Xenopus sp.* sont des grenouilles entièrement aquatiques qui vivent dans des étendues stagnantes d'eau douce comme des étangs et marais. Ce sont des animaux nocturnes et territoriaux qui vivent en groupe. Ils sont ectothermes et dépendent donc de leur environnement pour maintenir leur température corporelle. Ils sont carnivores et ont un appétit vorace, et peuvent occasionnellement avoir un comportement de charognard ou pratiquer le cannibalisme en mangeant des têtards ou leurs propres œufs [18].

## **Utilisation en recherche**

### **Détection de la grossesse**

La grenouille *Xenopus laevis* est d'abord et avant tout un animal de laboratoire. De son Afrique natale, elle a conquis les instituts de recherche de la planète à partir des années 1930 en raison de sa popularité comme modèle animal dans plusieurs domaines incluant la biologie développementale, la biologie cellulaire, la physiologie, l'endocrinologie, la biochimie et la toxicologie [18, 19].

La popularité de la grenouille *Xenopus laevis* a connu un premier essor important à partir des années 1930, après qu'un chercheur du nom de Hogben eût démontré que cet animal pouvait être utilisé pour diagnostiquer la grossesse chez la femme, puisqu'elle est sensible à l'hormone chorionique gonadotrope humaine [20]. Dans le cadre d'un test éventuellement connu sous le nom de test de Hogben, on injectait un extrait d'urine de femme dans le sac lymphatique dorsal d'une grenouille. La présence de gonadotrophine dans l'urine de femme enceinte entraînait l'ovulation et la ponte dans les 18 heures suivantes [21]. Le test de Hogben a rapidement détrôné les tests comparables qui étaient pratiqués à l'époque sur des souris et des lapins mais qui nécessitaient la mort de l'animal pour détecter l'ovulation. De ce fait, un animal pouvait désormais être utilisé pour plus d'un test de grossesse, ce qui constituait une amélioration notable [20]. Le test de Hogben a été développé et popularisé par des chercheurs de l'Université d'Édimbourg qui, au tournant des années 1950, pratiquaient plus de 20 000 tests de grossesse sur des grenouilles *Xenopus laevis* annuellement, ce qui a permis l'essor de cette espèce comme animal de laboratoire [20, 21].

Le test de Hogben a été rendu obsolète dans les années 1960 grâce à des avancées importantes dans le domaine de l'immunologie, mais l'essor de la grenouille africaine à griffes comme animal de laboratoire était déjà en marche.

### **Recherche sur les oocytes**

Malgré toutes les belles qualités de la grenouille africaine à griffes, son immense popularité en recherche encore de nos jours est principalement attribuable à une seule de ses cellules, la plus grosse de toutes avec son diamètre de 1,3mm, qui a permis des avancées majeures dans différents domaines incluant la biochimie, la biologie moléculaire et la physiologie : l'oocyte. Cette cellule a une taille importante qui facilite sa visualisation et sa manipulation par des chercheurs, tout en possédant plusieurs des structures qu'on retrouve dans les cellules somatiques [19].

La popularité des oocytes de *Xenopus laevis* a débuté à la fin des années 1950, lorsque John Gurdon a démontré qu'un embryon pouvait se développer à partir d'un oocyte sans noyau auquel on avait injecté de l'ADN de cellules somatiques [22]. Cette expérience a grandement contribué à l'avancement de la recherche sur les cellules souches. De plus, on a plus tard découvert qu'un oocyte auquel on injecte de l'ARN messager traduit cet ARN en protéines qui s'accumulent ensuite dans le cytoplasme [23]. Les recherches sur la traduction de molécules d'ARN ont par la suite permis plusieurs découvertes majeures, par exemple sur la fonction des canaux ioniques et des aquaporines [19]. Peter Agre a d'ailleurs remporté un prix Nobel grâce à une expérience fameuse dans laquelle il injectait de l'ARN messager à des oocytes pour ensuite les voir se gonfler d'eau jusqu'à se rompre : les aquaporines étaient nées [24].

### **FETAX**

Dans les années 1980, un test utilisant des embryons de *Xenopus laevis* a été développé pour permettre de détecter les substances présentes dans notre environnement pouvant causer des anomalies congénitales [25]. Ce test, connu sous le nom de FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus), a été développé à partir d'une expérience

d'Edminsten *et al.* qui ont utilisé des larves de *Xenopus* pour démontrer la toxicité du naphthalène, un des composants les plus toxiques du pétrole brut. Son système utilisait cinq bassins contenant différentes concentrations du produit à tester, dont un bassin contrôle, et mesurait l'effet du produit sur le taux de mortalité, la pigmentation cutanée et la mobilité des larves [26]. Le test FETAX utilise des œufs fécondés qui sont mis en présence du produit à tester durant la période de l'organogénèse. Il est peu coûteux, nécessite une petite quantité de produit à tester et est très rapide comparativement aux autres tests de tératogénicité *in vivo* puisque seulement 96 heures sont écoulées entre la fertilisation des œufs et l'analyse des larves suite à leur incubation en présence du produit [27]. Le test FETAX permet encore aujourd'hui de vérifier le potentiel tératogène de nombreux médicaments, produits chimiques industriels, herbicides, insecticides, métaux lourds et autres contaminants environnementaux, contribuant à la popularité des grenouilles *Xenopus* comme animal de laboratoire [28-33]. Le test FETAX a même été utilisé pour mesurer le potentiel tératogène de l'huile de clou de girofle; les malformations les plus souvent observées étaient des courbures axiales, des malformations du tractus gastro-intestinal, de la microphthalmie et de l'œdème [34].

## **L'anesthésie des amphibiens**

### **La douleur chez les amphibiens**

La notion de douleur chez les espèces inférieures de vertébrés, comme les amphibiens, a longtemps été mal comprise. La façon de démontrer la douleur est différente chez ces espèces, les mécanismes modulant la nociception ont été moins étudiés que chez les mammifères et les agents analgésiques et anesthésiques ayant été démontrés efficaces et sécuritaires chez les amphibiens sont moins nombreux. Cependant, les amphibiens ont un système nerveux capable de reconnaître la douleur et de nombreuses recherches tendent à démontrer que la perception de la douleur chez les amphibiens est similaire à celle des mammifères [35, 36]. Pour ces raisons, les procédures expérimentales, diagnostiques ou thérapeutiques potentiellement douloureuses devraient être faites avec un protocole analgésique ou anesthésique adéquat. Les drogues disponibles pour y arriver sont cependant peu nombreuses, les doses requises sont parfois mal définies et le potentiel toxique est souvent inconnu chez la grenouille.

Bien que plusieurs des drogues utilisées pour l'anesthésie des amphibiens aient aussi été utilisées chez plusieurs espèces de vertébrés supérieurs incluant les mammifères, la prudence est de mise lorsque vient le temps d'utiliser ces drogues chez les amphibiens. En raison de caractéristiques anatomiques et physiologiques uniques, la réponse d'un amphibien à une substance anesthésique peut grandement varier selon l'espèce, le poids, le stade de développement, le milieu et la température ambiante [36-40]. De plus, la plupart de nos connaissances sur l'anesthésie des amphibiens proviennent d'un nombre limité d'espèces, soit la grenouille africaine à griffes (*Xenopus laevis*), la grenouille léopard (*Rana pipiens*) et le ouaouaron (*Rana catesbeiana*) [13, 14, 41-47]. Il serait donc souhaitable de faire preuve de précaution avant d'appliquer nos connaissances acquises chez ces trois espèces à des individus d'espèces éloignées, par exemple en s'assurant de l'efficacité et de la sécurité d'un médicament sur un petit nombre d'individus avant d'anesthésier un grand nombre d'amphibiens d'une espèce pour laquelle nos connaissances sont limitées.

Évidemment, le choix de l'anesthésique et de la voie d'administration sera dicté par les besoins du chercheur ou du clinicien. Comme chez les mammifères, on doit aussi s'assurer du bon déroulement de l'anesthésie grâce à un protocole anesthésique comprenant un examen pré-anesthésique, un suivi anesthésique avec évaluation de la profondeur de l'anesthésie et suivi des fonctions cardiaque et respiratoire, ainsi qu'un suivi de la période post-anesthésique pour un réveil sécuritaire.

### **Examen pré-anesthésique, suivi de l'anesthésie et période de réveil**

Tout comme chez les mammifères, l'examen clinique précédant l'anesthésie est important. Celui-ci permet d'évaluer la santé de l'animal et les risques associés à l'anesthésie, d'identifier et de corriger des problèmes de santé pouvant compromettre l'anesthésie ou d'adapter le protocole anesthésique en fonction de la condition de l'animal [37]. La fonction cardiorespiratoire du patient anesthésié et la profondeur de l'anesthésie doivent par la suite être suivies tout au long de l'anesthésie.

#### **Examen pré-anesthésique**

Comme chez les autres vertébrés, l'examen pré-anesthésique doit au minimum comprendre un examen physique qui peut être accompagné de procédures diagnostiques additionnelles. Cet examen débute par un examen à distance de l'animal pour évaluer la qualité de la respiration, l'allure générale, le comportement et la locomotion de l'animal. Par la suite, l'examen physique est fait en contentionnant doucement l'animal [37]. Le port de gants de latex est recommandé pour éviter d'endommager la peau fragile de l'animal, et les manipulations sont faites de manière à ne pas enlever la couche de mucus qui recouvre la peau et qui sert de barrière protectrice contre les pathogènes et les abrasions [18, 37]. L'examen inclut l'évaluation de la cavité orale, de la peau, de l'état de chair et de la musculature. Chez plusieurs espèces, la cavité coelomique et les organes associés peuvent aussi être visualisés par transillumination [37].

L'examen physique peut être complété par des analyses sanguines. Les prélèvements sanguins peuvent toutefois être techniquement difficiles à réaliser et la veine optimale pour

y arriver varie en fonction de l'espèce. Chez les anoues, les vaisseaux sublinguaux sont recommandés [37].

### **Profondeur de l'anesthésie et suivi cardio-respiratoire**

L'amphibien ayant reçu un agent anesthésique traversera différents stades d'anesthésie allant de la sédation légère à l'anesthésie profonde. Le stade de l'anesthésie recherché variera en fonction de la procédure diagnostique, thérapeutique ou expérimentale à effectuer et du niveau de douleur qui y est associé. Quelques tests simples permettent de déterminer si le stade recherché a été atteint. Ces tests permettront aussi éventuellement de comparer les anesthésiques entre eux dans le cadre de projets de recherche.

Le premier stade de l'anesthésie comprend une phase d'excitation paradoxale qui peut être associée à un érythème transitoire observable sur l'abdomen et les autres régions peu pigmentées du corps [36]. Durant cette phase, les anoues seront excités et effectueront des mouvements brusques et aléatoires pour tenter de s'échapper [48]. Par la suite, il y aura successivement une perte du réflexe de retournement et du réflexe cornéen (anesthésie légère), puis une absence de mouvements spontanés et une perte des mouvements respiratoires abdominaux et gutturaux. À un stade plus profond, il n'y aura plus de mouvements de retrait en réponse à un stimulus nociceptif (anesthésie chirurgicale) [14, 36, 40, 48, 49].

Les principaux tests utilisés pour évaluer la profondeur de l'anesthésie, tels qu'expliqués ci-après, sont l'évaluation du réflexe de retournement et du réflexe de retrait ainsi que le test à l'acide acétique. La réponse à une incision chirurgicale constitue un autre moyen objectif de vérifier la profondeur de l'anesthésie. Parallèlement, la mesure de la fréquence cardiaque et respiratoire permet de mesurer l'effet de l'anesthésie sur le système cardio-respiratoire et assure ainsi un suivi de l'animal avant, pendant et après l'anesthésie [14].

### *Réflexe de retournement*

L'évaluation du réflexe de retournement consiste à placer l'animal sur le dos et à observer sa capacité à se remettre en position ventrale [14]. Certains auteurs considèrent que l'anesthésie est induite lorsqu'il y a perte du réflexe de retournement [39].

### *Réflexe cornéen*

Le réflexe cornéen est évalué en touchant délicatement la cornée à l'aide d'un coton-tige humide, ce qui devrait normalement entraîner un clignement des yeux de l'animal [13]. Avec le réflexe de retournement, le réflexe cornéen est un des premiers à être perdus lors d'anesthésie légère [36].

### *Réflexe de retrait*

L'évaluation du réflexe de retrait sert à déterminer s'il y a une réponse de l'animal à un stimulus nociceptif. La perception de la douleur superficielle peut être évaluée en pinçant la peau interdigitée à l'aide de pinces chirurgicales [13], tandis que la perception de la douleur profonde est évaluée par le pincement d'un membre pelvien ou d'un orteil. Un animal anesthésié est immobile et devrait le rester suite au stimulus nociceptif; le réflexe de retrait est considéré positif s'il y a un mouvement volontaire d'un membre autre que celui stimulé [40, 41, 43, 47]. La présence de mouvements non-spécifiques suite au stimulus, comme les mouvements de la mâchoire, les fasciculations musculaires et les contractions abdominales, n'indiquent pas que le réflexe de retrait est encore présent [43]. On considère généralement qu'un amphibien est anesthésié lorsqu'il y a à la fois perte du réflexe de retournement et du réflexe de retrait [40, 41, 48]. La perte du réflexe de retournement seulement n'est généralement pas considérée suffisante pour une anesthésie chirurgicale, puisque des grenouilles ayant perdu le réflexe de retournement peuvent toujours réagir à des procédures expérimentales telle l'injection d'implants [40].

### *Test à l'acide acétique*

Le test à l'acide acétique est un des principaux tests utilisés chez les amphibiens pour évaluer la perception de la douleur; il peut ainsi donner une indication du pouvoir

analgésique d'une molécule et permettre de comparer les analgésiques entre eux [35, 49]. Ce test est basé sur le réflexe d'essuyage, un réflexe médié par la moelle épinière et qui fait que l'animal utilisera un membre pelvien pour enlever un stimulus nociceptif sur le membre controlatéral [35]. Le test consiste à appliquer une faible quantité (10 à 20  $\mu$ L) d'acide acétique à des concentrations croissantes (0% à 100%) sur la peau d'un membre pelvien jusqu'à atteindre le seuil nociceptif, qui correspond à la plus basse concentration qui stimule le réflexe d'essuyage [14, 35, 49]. On place donc un volume déterminé d'acide acétique sur un membre pelvien à l'aide d'une pipette, et en absence de réponse, on applique une concentration plus élevée sur le membre opposé. Il est important de rincer le membre testé avec de l'eau distillée après 5 secondes de contact avec l'acide acétique pour prévenir une irritation de la peau [14, 49]. Le test à l'acide acétique a remplacé l'évaluation de la réponse à la chaleur ou à des chocs électriques qui évoquaient des réponses très variables d'un animal à un autre [35].

#### *Réponse à une incision chirurgicale*

On peut aussi mesurer la profondeur de l'anesthésie en pratiquant une incision de la peau et des muscles de la paroi abdominale et en évaluant s'il y a une réponse sous forme de contractions musculaires ou changement de la fréquence respiratoire et/ou cardiaque [14]. Cette méthode d'évaluation de l'anesthésie pourrait être la plus appropriée pour déterminer si le niveau d'anesthésie est adéquat pour une chirurgie de courte durée. Évidemment, cette technique invasive est utilisée pour tester de nouveaux anesthésiques dans le cadre d'un projet de recherche et non pour mesurer la profondeur de l'anesthésie lors de procédures de routine. À noter que cette technique est plus sensible que l'évaluation du réflexe de retrait puisque des animaux ayant perdu le réflexe de retrait peuvent réagir à une incision [14].

#### *Fréquence cardiaque*

Le moyen le plus simple et efficace de mesurer la fréquence cardiaque chez la grenouille est l'utilisation d'une sonde Doppler placée sur le sternum de l'animal [36, 41]. Cependant, la mesure de la fréquence cardiaque avec le Doppler peut être plus difficile à réaliser

lorsque les animaux ne sont pas immobilisés, par exemple pour obtenir des valeurs de référence pré-anesthésie. Une sonde Doppler peut aussi être placée sur un vaisseau sanguin périphérique (veine abdominale ou fémorale, artère iliaque) dans le but de détecter une éventuelle diminution du débit sanguin périphérique et retirer l'animal de la solution anesthésique s'il y a lieu [48].

La fréquence cardiaque peut aussi être évaluée à l'aide d'un électrocardiogramme. L'électrocardiographie requiert une certaine forme de contention, qui peut être obtenue en suspendant l'animal dans une camisole en plastique avec des trous pour les membres. Les dérivations analysées sont les mêmes que chez les mammifères, et on peut de cette façon analyser plus précisément l'effet d'un anesthésique sur la fonction cardiaque et potentiellement détecter un effet sur la durée des différentes phases de la contraction cardiaque [47]. Finalement, la fréquence cardiaque peut être mesurée par visualisation directe des battements cardiaques près de l'appendice xyphoïde [36].

Bien que l'anesthésie puisse entraîner une légère diminution de la fréquence cardiaque, celle-ci ne devrait pas diminuer de plus de 20%, auquel cas l'animal devrait être retiré de la solution et rincé abondamment avec de l'eau fraîche pour augmenter l'excrétion du médicament [48]. Si la fréquence cardiaque demeure anormalement basse, de l'épinéphrine peut être administrée par voie intratrachéale et un message cardiaque peut être tenté [36].

#### *Fréquence respiratoire*

La fréquence respiratoire peut être mesurée en comptant les mouvements des narines, de la gorge ou les mouvements abdominaux [13, 41]. La fréquence respiratoire des amphibiens chute souvent de façon drastique durant l'anesthésie, peu importe l'anesthésique et la voie d'administration utilisés. Il est possible que la fréquence ne soit que de quelques respirations par minute, et certains animaux ne démontreront aucun mouvement respiratoire pendant plusieurs minutes [13-15, 41, 43]. L'apnée prolongée ne cause généralement pas d'effets néfastes sur la santé de ces animaux, probablement parce que les échanges gazeux cutanés suffisent durant cette période. Il est cependant recommandé de s'assurer d'une

bonne oxygénation de l'eau lors de l'anesthésie par immersion pour prévenir les complications liées à l'apnée [37, 48].

### **La période de réveil**

Lors de la période de réveil, les amphibiens doivent être placés sur une gaze ou une serviette humide ou bien dans un contenant renfermant une petite quantité d'eau tout en s'assurant que les narines soient émergées [36]. Puisque la peau des grenouilles est non-kératinisée et semiperméable pour permettre les échanges liquides et gazeux, la déshydratation peut se produire rapidement chez les grenouilles retirées de leur milieu aquatique. De plus, les amphibiens aquatiques ont une faible capacité de régulation des pertes d'eau cutanées et ne peuvent pas concentrer leur urine en réponse à la déshydratation. Pour ces raisons, il est important de maintenir une bonne hydratation de la peau suite à l'anesthésie [36, 50]. On peut par ailleurs accélérer le réveil de l'animal en le rinçant à l'eau fraîche, ce qui augmentera l'excrétion de l'anesthésique [48]. L'animal pourra être retourné dans son aquarium ou son milieu naturel lorsque le réflexe de retournement sera revenu [36].

## **Voies d'administration de médicaments anesthésiques**

### **Immersion**

La façon de loin la plus commune d'administrer des médicaments anesthésiques chez les amphibiens est l'immersion, qui consiste à plonger l'animal dans une solution aqueuse contenant une concentration donnée d'un agent anesthésique. Cette voie d'administration est celle généralement utilisée pour les trois agents les plus populaires pour l'anesthésie des amphibiens, soit le MS-222, la benzocaïne et l'eugénol, bien que d'autres voies soient possibles pour ces médicaments [13, 14, 40, 41, 47, 51]. Il s'agit d'une méthode simple et efficace qui minimise les manipulations de l'animal et permet d'anesthésier plusieurs individus à la fois [36]. L'anesthésie par immersion est rendue possible par la peau des amphibiens qui possède des caractéristiques uniques; elle est richement vascularisée, non-kératinisée et perméable aux gaz, liquides et solutés [18, 36, 52].

Lors de l'induction de l'anesthésie par immersion, l'animal est placé dans une chambre d'induction contenant la solution anesthésique (Figure 2). Cette chambre d'induction peut être un sac en plastique transparent, un plat de plastique, métal ou styromousse ou encore une boîte de polycarbonate [14, 48]. Puisque les anoues ont tendance à faire des mouvements brusques pour tenter de s'échapper de la chambre d'induction, il est recommandé de protéger les rebords de celle-ci à l'aide de matériel qui absorbe les chocs et de s'assurer que la chambre d'induction soit munie d'un couvercle étanche [48]. On doit par ailleurs s'assurer que le pH de la solution utilisée pour l'immersion soit adéquat et que l'animal ne soit pas complètement submergé de façon à ce que les narines demeurent hors de l'eau [13, 36, 47]. Si la qualité de l'eau de l'aquarium dans lequel vit l'animal est adéquate, il est recommandé d'utiliser cette eau pour préparer la solution anesthésique afin de minimiser les problèmes de santé liés aux changements de milieu [48]. Puisque l'anesthésie chez les amphibiens s'accompagne souvent d'une période d'apnée, on peut oxygéner l'eau pour maximiser l'absorption d'oxygène par la peau et ainsi minimiser les risques d'hypoxie [53]. Par ailleurs, certaines solutions peuvent être irritantes pour la peau des amphibiens et entraîner une production accrue de mucus sur la peau, auquel cas l'administration devrait être cessée et l'animal rincé [36].



**Figure 2.** Grenouilles *Xenopus laevis* immergées dans une solution aqueuse d'eugénol.

### **Administration topique**

Outre l'immersion qui pourrait être considérée comme une administration topique, d'autres façons d'administrer des médicaments anesthésiques par la peau existent. Les médicaments peuvent être appliqués directement sur la peau, par exemple par ruissellement, ou bien on peut placer sur la peau un tampon absorbant imbibé de l'anesthésique [14, 44, 54]. Comparativement à l'immersion, l'administration topique possède l'avantage de requérir un plus petit volume de médicament puisque celui-ci n'est pas dilué. Cependant, il y a un plus grand risque de toxicité si la drogue est rapidement absorbée par la peau [37].

### **Injection parentérale**

#### *Intracoelomique*

La cavité corporelle des amphibiens se nomme la cavité coelomique, puisqu'en l'absence de diaphragme, il n'y a pas de séparation entre la cavité abdominale et la cavité thoracique. En plus des organes digestifs et des autres organes qu'on retrouve aussi chez les autres vertébrés comme les mammifères, la cavité coelomique est principalement occupée par des réserves graisseuses en forme de doigts que l'on appelle corps adipeux et, chez les femelles matures, par la grappe ovarienne pouvant contenir quelques milliers d'oocytes [18]. La cavité coelomique est la voie la plus courante pour administrer des anesthésiques par injection chez les amphibiens. On obtient de bons résultats avec le MS-222, tandis que les résultats sont variables avec les autres anesthésiques testés [44, 45, 51, 55].

L'injection intracoelomique est utilisée en raison de la durée d'anesthésie plus longue et de la plus petite quantité de médicament requise. De plus, puisque l'anesthésie par immersion est dépendante de l'absorption cutanée, celle-ci est limitée par le ratio surface/volume chez les individus de grande taille. L'injection intracoelomique permet de contourner cette limitation [45]. Certains auteurs utilisent la voie intracoelomique pour avoir une période d'induction plus courte, alors que d'autres rapportent que l'effet est retardé [37, 45]. L'injection intracoelomique nécessite cependant de connaître le poids de l'animal et entraîne des manipulations supplémentaires pour préparer une solution stérile [45, 53].

### *Sous-cutanée*

L'injection sous-cutanée peut être faite chez les amphibiens appartenant à l'ordre des anoures, c'est-à-dire chez la majorité des espèces de grenouilles et de crapauds communs, qui ont un espace sous-cutané important [36]. Chez ces espèces, la peau est lâchement attachée aux muscles sous-jacents et l'espace sous-cutané est divisé en différents sacs lymphatiques par de fines membranes transparentes. Les injections sous-cutanées sont généralement faites dans le sac lymphatique dorsal et les médicaments rejoignent la circulation veineuse avec l'aide des cœurs lymphatiques, de petites structures contractiles situées sous la peau [18]. Bien que techniquement faciles à réaliser chez les anoures, les injections sous-cutanées d'anesthésiques ne permettent généralement pas d'atteindre un niveau d'anesthésie adéquat de manière constante avec un réveil sécuritaire [14, 44]. Chez d'autres espèces d'amphibiens comme les salamandres et les gymnophiones (amphibiens sans pattes), les injections sous-cutanées peuvent difficilement être réalisées puisque la peau est fermement adhérente aux muscles sous-jacents [36].

### *Intramusculaire*

Les injections intramusculaires se pratiquent facilement dans les membres thoraciques ou pelviens si la masse musculaire est suffisamment développée. Cependant, peu des anesthésiques testés sont efficaces lorsqu'injectés dans les muscles et donc cette voie est rarement utilisée pour l'administration d'anesthésiques [13, 36, 44, 46].

### *Intravasculaire*

Des injections de médicaments anesthésiques dans le plexus sublingual, la veine abdominale ventrale ou la veine fémorale sont rapportées chez les amphibiens de grande taille [37]. Chez les petits amphibiens, l'injection intravasculaire est difficile et des tentatives d'injecter dans le plexus veineux sublingual peuvent résulter en une injection périvasculaire et une absence d'anesthésie [13].

### *Intra-osseuse*

Des injections intra-osseuses dans le fémur ou le tibia sont aussi rapportées [37]. Ces injections ne sont cependant possibles que chez les individus de grande taille [36].

## **Inhalation**

L'administration de médicaments anesthésiques par inhalation est réalisée en plaçant la grenouille dans une chambre d'induction, similairement à ce qui est fait chez les petits mammifères. On peut soit vaporiser l'anesthésique dans la chambre d'induction ou y placer une boule de coton qui en est imbibée [42-44]. Puisque la perméabilité de la peau des amphibiens permet les échanges gazeux, l'anesthésique dans la chambre d'induction est en partie absorbé par la peau [43].

Les médicaments administrés par inhalation peuvent parfois être inefficaces à produire l'effet désiré, puisque l'anesthésie entraîne souvent une diminution marquée de la fréquence respiratoire et même une période plus ou moins longue d'apnée, autant pour les agents donnés par immersion que par inhalation [13, 14, 43, 47, 51]. Lors de l'apnée, l'absorption se fait principalement par la peau qui est perméable aux gaz [52]. Cette absorption est cependant moins efficace que l'absorption pulmonaire, puisque la peau reçoit seulement 20% du débit sanguin via l'artère pulmocutanée, comparativement à 100% du débit sanguin qui est dirigé vers les poumons chez les mammifères [56]. De plus, le cœur des grenouilles ne contient qu'un seul ventricule et le sang artériel et veineux s'y mélange en partie [57], et le débit cardiaque d'une grenouille est environ 3 à 4 fois moindre que celui d'un mammifère de taille comparable [56, 58]. Tous ces facteurs peuvent contribuer à diminuer l'efficacité de l'absorption pulmonaire des médicaments inhalés.

L'intubation d'une grenouille pour délivrer le gaz directement aux poumons est possible, surtout chez les individus de grande taille; cependant cette technique comporte des risques puisque la trachée est courte et fragile et le diamètre de la glotte est petit [18, 36, 37, 48]. De petits tubes endotrachéaux, des tubes à gavage, des cathéters urinaires ou des cathéters intraveineux peuvent être utilisés pour l'intubation [37, 48]. Puisque la trachée est courte, le tube ne doit pas être avancé trop loin pour éviter d'endommager les voies respiratoires inférieures [48]. Si on utilise une chambre d'induction, il est important d'y placer du papier absorbant humidifié pour prévenir la déshydratation [37].

Les gaz anesthésiques peuvent aussi être administrés en les vaporisant dans l'eau en présence d'oxygène. L'absorption se fait alors principalement par voie cutanée, et cette technique d'administration se situe donc quelque part entre l'inhalation et l'administration topique [44, 54].

Un des principaux désavantages de l'utilisation de gaz anesthésiques est le potentiel d'exposition du personnel à ces gaz, surtout lorsqu'une chambre d'induction est utilisée et que le système d'évacuation des gaz est inadéquat [48].

## **Drogues anesthésiques utilisées chez les amphibiens**

### **Huile de clou de girofle et eugénol**

L'huile de clou de girofle autant que l'eugénol sont utilisés pour l'anesthésie des amphibiens; cependant l'huile de clou de girofle contient plusieurs substances en plus de l'eugénol [1]. Ces médicaments ont démontré leur efficacité pour induire une anesthésie chirurgicale chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*), la grenouille africaine à griffes (*Xenopus laevis*) et la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*) lorsqu'administrés par immersion [13-15].

Chez la grenouille *Xenopus laevis*, l'eugénol a été testé par immersion dans un bain de 350mg/L pendant 15 minutes chez des femelles de 90 à 140g. Ceci a produit une anesthésie chirurgicale d'au moins 30 minutes chez la plupart des sujets avec un certain niveau d'analgésie résiduelle, suggérant que cette technique d'anesthésie pourrait être utilisée lors de courtes procédures chirurgicales [14]. Le temps d'induction était généralement court (15 minutes) et le réflexe de retournement était revenu après 70 minutes en moyenne. De plus, l'eugénol semblait sécuritaire puisque les animaux euthanasiés 24 heures après l'anesthésie n'avaient pas de lésions histologiques dans le foie, les poumons, les reins, le cœur et les yeux. Les seuls effets secondaires étaient la présence de vomissements et de contractions abdominales chez quelques animaux durant le période d'induction et au réveil. Tous les animaux étaient en forme 24 heures après l'anesthésie [14]. L'injection sous-cutanée dans le sac lymphatique dorsal et l'application topique d'eugénol n'ont pas permis d'induire

l'anesthésie, et de la nécrose cutanée a même été observée suite à l'administration topique à des concentrations de 60 et 100 mg/mL [14, 59].

En ce qui a trait aux grenouilles léopard (*Rana pipiens*), l'immersion dans une solution aqueuse contenant 300 µl/L d'huile de clou de girofle pendant 15 minutes a produit une anesthésie chirurgicale chez tous les animaux. Cependant, la durée de l'anesthésie était variable (entre 5 et 65 minutes) et des prolapsus gastriques ont été observés chez la moitié des animaux [13].

Chez la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*), l'immersion dans une solution d'huile de clou de girofle de 450 mg/L pendant 10 minutes a produit une anesthésie chirurgicale chez les deux tiers des animaux. La concentration requise pour la salamandre, une espèce terrestre, est donc plus élevée que celle requise pour les grenouilles léopard et *Xenopus* qui sont des espèces aquatiques. Chez la salamandre, l'induction de l'anesthésie à l'huile de clou de girofle était plus rapide qu'avec le propofol et durait plus longtemps. L'huile de clou de girofle entraînait une diminution significative de la fréquence cardiaque, sans effet sur la fréquence respiratoire [15].

### **MS-222**

L'anesthésique le plus largement utilisé pour l'anesthésie des amphibiens est le méthanesulfonate de tricaïne [36, 45, 60]. Mieux connu sous le nom de MS-222 et commercialisé depuis 1920, il s'agit d'un isomère soluble de la benzocaïne vendu sous le nom commercial de Fiquel [53]. Le MS-222 est une poudre qui doit être dissoute dans l'eau et dont l'acidité doit être neutralisée par du bicarbonate ou du phosphate de sodium jusqu'à l'obtention d'un pH de 7,0 à 7,4 [36, 60]. En effet, le MS-222 en solution pouvant atteindre un pH aussi bas que 3,0, il y a un risque d'acidose métabolique associé à l'utilisation de MS-222 non-neutralisé [36, 48]. De plus, en solution acide, le MS-222 est majoritairement dans sa forme non-ionisée, ce qui réduit son absorption [48]. Une fois préparée, la solution doit être gardée au froid et à l'abri de la lumière jusqu'à la prochaine utilisation [60].

Le MS-222 est généralement administré par immersion dans un bain dont la concentration varie en fonction du stade de développement de l'animal [36]. Les concentrations

généralement recommandées sont de 0,2 g/L (0,02%) pour les têtards et les petits amphibiens, de 1,0 g/L (0,1%) pour les grenouilles aquatiques adultes, et jusqu'à 3,0 g/L (0,3%) pour les espèces terrestres [33, 56]. L'induction de l'anesthésie survient généralement en moins de 30 minutes, suite à quoi la grenouille doit être retirée de la solution et placée dans une petite quantité d'eau fraîche ou sur une gaze humide [36, 51, 53]. La période de réveil est relativement courte et survient 30 à 90 minutes après le retrait de l'animal de la solution [36]. Le MS-222 présente donc à la fois les avantages d'une induction courte et d'un réveil rapide; ceci est en partie attribuable à son métabolisme qui se produit principalement par hydrolyse et aussi par conjugaison. Les enzymes nécessaires à ce métabolisme sont peu présentes dans le foie des amphibiens comparativement aux mammifères, ce qui permet de maintenir une concentration sanguine suffisante pour atteindre l'anesthésie, ce qui n'est pas possible chez les mammifères en raison d'un métabolisme trop rapide. Ces voies métaboliques sont cependant présentes dans plusieurs autres tissus, permettant de transformer le MS-222 en métabolites qui sont ensuite principalement éliminés par la peau et les reins [61, 62]. L'anesthésie au MS-222 peut entraîner une diminution marquée de la fréquence respiratoire dans les 15 à 30 premières minutes, mais il n'y a pas d'effet observable sur la saturation en oxygène du sang ou sur la fréquence cardiaque [63].

Le temps de demi-vie du MS-222 chez la grenouille *Xenopus* est relativement court, soit de 3,2 heures, ce qui suggère qu'il n'y aurait pas d'accumulation d'eugénol dans l'organisme suite à des administrations multiples. Le temps d'anesthésie varie en fonction de la dose; par exemple, suite à une immersion de 20 minutes, les chirurgies doivent être pratiquées en moins de 30 minutes si on utilise une solution de 1 g/L et en moins de 60 minutes pour une solution de 2 g/L [63]. Si le réveil survient trop rapidement, on peut placer l'animal dans une solution anesthésique diluée à 50% ou verser quelques gouttes de la solution sur le dos de l'animal pour induire à nouveau l'anesthésie [48, 53]. On peut par ailleurs accélérer le réveil en rinçant la peau avec de l'eau bien oxygénée; en effet, placer la grenouille sous l'eau courante permet de réduire le temps de demi-vie de plus de la moitié [48, 61]. Des auteurs rapportent que le MS-222 serait plus sécuritaire que la benzocaïne pour l'anesthésie

des amphibiens en raison d'une marge sécuritaire plus grande et d'effets dépresseurs moins prononcés sur le système respiratoire [47].

Le MS-222 peut aussi être donné par injection intracoelomique [45, 61, 62]. Des doses intracoelomiques de 100 à 400 mg/kg permettent d'induire rapidement l'anesthésie ou la tranquillisation chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*) et le ouaouaron (*Rana catesbeiana*). Cependant, des mortalités sont observées chez la grenouille léopard à partir de 250 mg/kg, avec un taux de mortalité de 11% à 250 mg/kg et de 50% à 400 mg/kg. Même en injectant du MS-222 non-neutralisé à un pH de 1,75, il n'y a pas d'évidence que l'injection intracoelomique est irritante puisqu'il n'y a pas de lésions macroscopiques ou microscopiques associées. De plus, le MS-222 insensibilise rapidement la cavité coelomique, rendant l'injection non-douloureuse [45]. L'injection de MS-222 dans le sac lymphatique dorsal est aussi possible [53].

Le MS-222 possède une grande marge de sécurité chez les amphibiens; le principal inconvénient associé à son utilisation est le risque de lésions rétinienes chez les personnes exposées au produit. En effet, une perte de vision a été observée chez un ichthyopathologiste ayant été exposé de façon chronique au MS-222, principalement par voie cutanée. Les déficits visuels chez cet individu étaient associés à des changements marqués mais réversibles à l'électrorétinographie. Des précautions comme le port de gants sont donc recommandées en présence de MS-222 [64]. Par ailleurs, il a été démontré que le MS-222 avait un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries Gram négatif que l'on retrouve en milieu aquatique. Une concentration de 5,0 g/L, bien au-delà des concentrations utilisées pour l'anesthésie des amphibiens, inhibe la croissance de toutes les espèces bactériennes, tandis qu'une concentration de 0,2 g/L, environ 5 fois inférieure à la concentration anesthésique, réduit la croissance de plusieurs de ces espèces [40, 65]. Bien que ceci n'ait pas d'effet observable sur la santé des animaux, cet effet doit être pris en considération si des tests bactériologiques sont effectués sur des grenouilles ayant été anesthésiées au MS-222.

### **Benzocaïne**

La benzocaïne a été testée avec succès comme alternative au MS-222 pour l'anesthésie de différentes espèces d'amphibiens incluant la rainette grillon (*Acris crepitans*), le crapaud de Fowler (*Bufo fowleri*) et quelques espèces de salamandres (*Ambystoma talpoideum*, *Desmognathus fuscus*), [19, 40, 66]. La benzocaïne utilisée est celle vendue sous forme de gel pour l'anesthésie locale dans le cas de douleurs dentaires chez les enfants. Vendue sous différentes appellations (Anbesol, Orajel), différentes concentrations sont disponibles mais les formulations à 20% sont principalement utilisées chez les amphibiens [40].

La benzocaïne est principalement administrée par immersion et doit donc être dissoute dans une solution aqueuse; elle est cependant peu soluble dans l'eau et on peut augmenter sa solubilité en la diluant préalablement dans l'alcool [35]. Les concentrations recommandées pour l'anesthésie des adultes varient de 0,1 g/L à 0,3 g/L, mais peuvent être de 0,05 à 0,1 g/L pour les formes larvaires ou pedomorphiques [19, 37, 39, 40]. Chez plusieurs espèces chez qui les effets du MS-222 et de la benzocaïne ont été comparés, les auteurs ont démontré un temps d'induction plus court et un réveil plus long avec la benzocaïne, suggérant que la benzocaïne est un anesthésique plus puissant chez ces espèces. Cependant, ces résultats ont été obtenus en comparant avec du MS-222 non-neutralisé, ce qui pourrait avoir diminué son absorption [39, 40]. L'induction plus rapide et le temps d'anesthésie plus long obtenus avec la benzocaïne pourraient être avantageux pour les chercheurs ou vétérinaires ayant à pratiquer des procédures plus longues. Cependant, pour des chercheurs ayant besoin d'un temps d'anesthésie court, le MS-222 pourrait être l'anesthésique de choix [40].

Le gel de benzocaïne offre plusieurs autres avantages sur le MS-222 : ce produit peut être facilement obtenu sans ordonnance dans toutes les pharmacies et il est généralement vendu dans un tube facile à transporter et à entreposer, ce qui peut être pratique pour des chercheurs ayant à réaliser des anesthésies dans le champ [39, 40, 48, 67]. De plus, une dose d'Orajel coûte légèrement moins cher qu'une dose de MS-222 [39, 40]. Cependant, malgré plusieurs avantages potentiels de la benzocaïne, plusieurs cliniciens et chercheurs

préféreront le MS-222 s'il est disponible puisqu'il est fiable et offre des résultats constants [37, 48].

### **Gaz anesthésiques**

Les premiers gaz utilisés pour anesthésier des amphibiens ont été l'éther et l'uréthane, mais ces produits ne sont plus utilisés de nos jours puisqu'ils sont respectivement explosif et cancérigène [13]. L'halothane a aussi déjà été utilisé, ainsi que l'isoflurane et le méthoxyflurane, qui sont des dérivés de l'éther plus stables et sécuritaires, avec des résultats variables selon les espèces et les voies d'administration [42-44, 48].

Le méthoxyflurane a été utilisé avec succès chez la grenouille léopard. Les animaux étaient placés dans une chambre d'induction contenant une boule de coton imbibée de l'anesthésique pendant 5 minutes, ce qui a permis d'induire une anesthésie chirurgicale pendant 40 minutes avec un temps de réveil atteignant 7 heures [42].

Pour ce qui est de l'isoflurane, l'anesthésie par inhalation a été réalisée chez la grenouille léopard à l'aide d'une chambre d'induction en utilisant une concentration de 1 à 1,5%. Cette concentration est similaire à celle nécessaire pour anesthésier des mammifères, cependant le temps d'induction est beaucoup plus long puisque la concentration sanguine d'isoflurane s'équilibre avec la concentration ambiante après 4 heures chez la grenouille comparativement à environ 15 minutes chez les mammifères [43]. D'autres auteurs recommandent une concentration de 5% pour l'induction et de 1 à 3% pour maintenir l'anesthésie [37].

L'isoflurane peut aussi être administrée par immersion. Une concentration de 0,28% permet d'obtenir une anesthésie chirurgicale et l'animal peut être retiré de la solution dès qu'il démontre des signes de sédation [54].

L'isoflurane peut aussi être vaporisée dans l'eau. Certains auteurs rapportent que cette technique est efficace et qu'une concentration de 5% permet d'induire l'anesthésie avec un temps d'induction plus court et un réveil plus long qu'avec l'immersion ou l'application topique [54]. Cependant, d'autres auteurs rapportent que différentes concentrations allant jusqu'à 5% sont inefficaces et provoquent chez l'animal un comportement s'apparentant à de la détresse [44].

L'application topique d'isoflurane semble aussi être efficace et sécuritaire. Elle peut être réalisée à l'aide d'un tampon absorbant saturé d'isoflurane placé sur le dos de la grenouille ou en faisant ruisseler le médicament directement sur l'animal [44, 54].

Chez la grenouille *Xenopus laevis*, les autres voies testées incluent l'injection intracoelomique, sous-cutanée ou intramusculaire. Les injections intracoelomique et sous-cutanée ont induit l'anesthésie mais le taux de mortalité était élevé et le réveil prolongé, tandis que l'injection intramusculaire était inefficace pour induire l'anesthésie [44].

### **Propofol**

Le propofol est un anesthésique à courte durée d'action qui est couramment utilisé chez plusieurs espèces animales et qui doit être injecté de façon intraveineuse chez ces espèces. Cependant, l'injection intraveineuse étant techniquement difficile à réaliser chez un amphibien conscient, des voies alternatives d'administration ont été testées, principalement l'injection intracoelomique, avec des résultats mitigés [13, 15, 41, 55].

Chez la rainette de White (*Litoria caerulea*), l'injection intracoelomique a produit des résultats prometteurs; une dose de 9,5 mg/kg a provoqué une sédation adéquate pour des procédures diagnostiques non-invasives, tandis qu'une dose de 30 mg/kg a induit un niveau d'anesthésie chirurgicale avec un temps d'induction court de 8 minutes. Cependant, la marge sécuritaire était mince, puisqu'une dose de 53 mg/kg provoque un arrêt respiratoire et cardiaque en une minute. De plus, ces résultats ont été obtenus sur une seule grenouille pour chaque dose testée [55]. Dans une autre étude, l'injection intracoelomique de 35 mg/kg de propofol chez des crapauds du Colorado (*Bufo alvarius*) a induit une anesthésie chirurgicale chez seulement un individu sur neuf, avec des temps d'induction et de réveil plus longs qu'avec le MS-222 [51]. Finalement, chez la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*), l'injection intracoelomique à des doses de 25 et 35 mg/kg a induit une anesthésie chirurgicale chez 40% et 83% des animaux respectivement. Le temps d'induction était beaucoup plus long qu'avec l'huile de clou de girofle, soit 45 à 50 minutes en moyenne avec un maximum de 80 minutes [15].

Le propofol a par la suite été testé par voie périsvasculaire autour du plexus sublingual chez la grenouille léopard et a produit une sédation chez tous les animaux et une anesthésie légère chez plusieurs mais pas tous les animaux, suggérant qu'il peut être utilisé comme sédatif mais n'est pas adéquat comme seul agent anesthésique chez les amphibiens avec cette voie d'administration [13]. Finalement, l'immersion dans une solution de propofol de 88 mg/L pendant 15 minutes permet d'obtenir une analgésie qui dure au moins 30 minutes, tel que démontré par la réponse à des stimuli nociceptifs comme l'acide acétique et le pincement des membres. Cependant, cette technique permet d'obtenir une anesthésie de courte durée (moins de 30 minutes) et superficielle, puisque certains animaux réagissent à une concentration élevée d'acide acétique. L'immersion dans des solutions plus concentrées de propofol (175 mg/L et plus) cause la mort de tous les animaux [41]. En résumé, aucune des voies d'administration testées avec le propofol (intracoelomique, périsvasculaire ou cutanée) n'est adéquate pour obtenir une anesthésie chirurgicale chez la grenouille en raison de la marge sécuritaire faible, de la courte durée et du niveau superficiel et variable de l'anesthésie obtenue.

### **Arylcyclohexylamines**

Parmi cette famille de molécules dont fait partie la kétamine et qui agissent comme antagonistes des récepteurs NMDA, certaines ont été testées pour l'anesthésie des grenouilles. Ces agents sont peu dispendieux et ont l'avantage de pouvoir être donnés par voie intramusculaire, seuls ou en association avec une benzodiazépine [37]. La littérature est contradictoire sur l'utilisation de la kétamine mais il semble qu'une dose intramusculaire de 70 à 100 mg/kg soit adéquate pour une anesthésie chirurgicale, bien que des contractions musculaires puissent se produire durant la chirurgie [48]. La tilétamine a quant à elle été testée par voie intramusculaire en combinaison avec la benzodiazépine zolazepam chez la grenouille léopard (*Rana pipiens*) et le ouaouaron (*Rana catesbeiana*). Cette combinaison anesthésique n'est cependant pas adéquate car des doses de 5 à 20 mg/kg donnent des résultats très variables, allant de la sédation légère à l'anesthésie, tandis qu'une dose de 50 mg/kg produit un haut taux de mortalité [46].

### **Agonistes alpha-adrénergiques**

Les agonistes alpha-adrénergiques incluent des produits qui sont couramment utilisés pour l'anesthésie et la sédation des animaux de ferme et des animaux de compagnie comme la xylazine et la médétomidine. Ils sont de bons sédatifs, entraînent la relaxation musculaire, ont un effet analgésique et peuvent être antagonisés [37]. Chez la grenouille léopard, une injection intramusculaire de médétomidine à une dose de 150 µg/kg n'a pas produit d'anesthésie ni même de sédation [13]. Les drogues de cette famille ne semblent donc pas adéquates pour l'anesthésie des amphibiens, bien que la dexmédétomidine et la clonidine aient démontré un certain pouvoir analgésique [68].

### **Hypothermie**

L'hypothermie a été utilisée pour l'anesthésie des amphibiens par des chercheurs qui craignaient que les anesthésiques interfèrent avec leur expérience, qui croyaient obtenir de meilleurs taux de survie avec l'hypothermie comparativement aux anesthésiques traditionnels ou qui avaient eu des expériences positives avec cette méthode dans le passé [69]. Tout comme chez les mammifères, l'hypothermie cause une diminution de la vitesse de conduction de l'influx nerveux chez les amphibiens [38]. Cependant, l'anesthésie se produit seulement quand il y a un arrêt complet de la transmission de l'influx nerveux, ce qui se devrait se produire à une température proche du point de congélation chez la grenouille. À cette température, le gel risquerait de causer des dommages aux tissus et il n'y aurait aucune analgésie résiduelle puisque la transmission de l'influx nerveux revient à la normale en même temps que la température corporelle [69]. L'hypothermie n'est donc généralement pas considérée comme une procédure anesthésique acceptable [37].

### **Autres**

L'immersion dans une solution d'éthanol et l'injection intracoelomique ou l'application topique de pentobarbital sodique ont été rapportées pour l'anesthésie des amphibiens. Cependant, les doses rapportées dans la littérature varient beaucoup et l'alcool peut

entraîner plusieurs effets secondaires indésirables; ces médicaments ne sont donc pas recommandés pour des anesthésies qui ne sont pas terminales [48].

## **Toxicité de l'eugénol et du clou de girofle**

Les effets toxiques de l'eugénol et du clou de girofle chez l'humain et les animaux sont variés et dépendent de la voie d'administration et de la dose administrée. Chez l'humain, la toxicité se manifeste principalement lors d'intoxications accidentelles, surtout chez les jeunes enfants. Chez les animaux, la toxicité se manifeste lors de procédures expérimentales visant à mieux comprendre les effets de l'eugénol sur l'organisme et déterminer les mécanismes par lesquels la toxicité se manifeste.

### **Toxicité par ingestion**

La majorité des cas d'intoxication chez l'humain se produisent après que de jeunes enfants aient accidentellement ingéré de l'huile de clou de girofle achetée pour traiter des douleurs dentaires ou comme agent d'aromathérapie. Les cas rapportés impliquent des enfants âgés de 3 mois à 2 ans, et puisque l'huile de clou de girofle est généralement vendue en contenants d'environ 10 ml, les intoxications font suite à l'ingestion d'une relativement petite quantité, soit 5 à 10 ml [70-74].

Les premiers signes cliniques suivant l'ingestion d'huile de clou de girofle impliquent le système nerveux central. Dans la première heure suivant l'ingestion, les patients ont un état de conscience altéré, sont moins alertes et peuvent être hypotoniques [70-72, 74]. Dans certains cas, il peut y avoir une progression vers le coma avec des convulsions généralisées dans les heures suivantes [70, 72].

Un des effets secondaires les plus sérieux de ces intoxications est la toxicité hépatique. Celle-ci survient dans les premières heures suivant l'ingestion et se manifeste par une augmentation parfois très marquée des niveaux de transaminases sanguines (ALT et AST) suggérant la présence de nécrose hépatocellulaire [70-73]. Les études chez l'homme et sur des modèles animaux suggèrent que cette nécrose hépatocellulaire serait due à un dommage oxydatif faisant suite à une perte de glutathion intracellulaire et de son effet antioxydant

cytoprotecteur [75-77]. En effet, chez les souris traitées avec de l'eugénol per os, les lésions hépatiques de nécrose centrolobulaire ne se manifestent que chez les animaux qui ont aussi reçu un inhibiteur de la synthèse du glutathion. Chez ces animaux, l'administration d'inhibiteurs du cytochrome P450 prévient partiellement ou complètement les lésions hépatiques, alors que les médicaments qui induisent le cytochrome P450 les aggravent [77]. La diminution du glutathion intracellulaire serait due à la formation de conjugués avec l'eugénol lorsque les autres voies de conjugaison de l'eugénol (avec le sulfate et le glucuronide principalement) sont saturées en raison de la grande quantité d'eugénol à métaboliser, et les lésions qui s'ensuivent sont au moins en partie attribuables à un métabolite de l'eugénol dépendant du cytochrome P450, probablement le méthylène quinone [75, 76, 78]. Ce mécanisme de toxicité hépatique est similaire à celui observé dans les cas d'intoxication à l'acétaminophène. Un traitement avec de la N-acétylcystéine est par ailleurs recommandé dans les cas d'intoxication à l'eugénol, tout comme pour les surdoses d'acétaminophène [72, 73].

Les déficits de coagulation sont souvent présents chez les enfants intoxiqués à l'huile de clou de girofle. Les anomalies rapportées sont nombreuses mais il y a principalement une augmentation du temps de prothrombine [70-73]. Une augmentation du temps de thromboplastine partielle, de la thrombocytopenie et de la coagulation intravasculaire disséminée sont aussi possibles [70]. Du méléna et de l'hématémèse ont aussi été observés, indiquant des saignements gastro-intestinaux, bien qu'il pourrait s'agir d'une toxicité directe de l'eugénol sur le système digestif plutôt qu'un effet de la coagulopathie [70, 71]. La coagulopathie survient chez des enfants qui démontrent aussi des signes d'insuffisance hépatique, et parfois même des déficits des facteurs de coagulation dépendants du foie; les désordres de coagulation pourraient donc être secondaires aux lésions hépatiques [70]. Cependant, il a été démontré que l'eugénol inhibait l'agrégation plaquettaire en diminuant la formation de thromboxane A<sub>2</sub>, ce qui peut aussi contribuer aux anomalies observées [79, 80].

Le système urinaire est aussi affecté lors d'intoxications à l'huile de clou de girofle et les désordres observés chez les enfants touchés sont une augmentation des niveaux sanguins

d'urée et de créatinine, ainsi que de la protéinurie et de l'hématurie [70, 72-74]. Ces anomalies sanguines et urinaires ont été attribuées à une toxicité rénale directe de l'eugénol par un auteur [74].

La toxicité subaiguë du clou de girofle a aussi été évaluée chez des rats qui ont été gavés avec 300 ou 700 mg/kg/jour d'un extrait aqueux de clou de girofle pendant 90 jours. Les auteurs ont rapporté de la lipidose et des infiltrats inflammatoires dans le foie, de la congestion et de l'œdème dans le cerveau, de la nécrose tubulaire dans les reins ainsi que des gastrites avec de la nécrose de l'estomac. Les lésions rénales étaient accompagnées d'une augmentation de l'urée sérique tandis que les changements hépatiques étaient associés à une augmentation de l'ALT [4]. Ces résultats sont cependant douteux, puisque l'œdème cérébral était aussi présent chez les animaux contrôles, suggérant un changement spontané ou artéfactuel. De plus, bien que les taux sériques d'urée étaient augmentés de façon statistiquement significative 2 semaines après la fin du traitement, ils étaient diminués après 90 jours de traitement chez les animaux ayant reçu la plus forte dose, ce qui est incompatible avec un effet toxique.

### **Toxicité par injection intraveineuse**

Deux articles mentionnent la toxicité de l'eugénol et de l'huile de clou de girofle lorsqu'administrés par voie intraveineuse. Le premier rapporte le cas d'une femme de 32 ans s'étant volontairement injecté une dose intraveineuse d'huile de clou de girofle. Cette femme avait été une utilisatrice de drogues intraveineuses et a décidé de s'injecter l'huile de clou de girofle que son dentiste lui avait prescrite pour une douleur aux gencives. L'injection a provoqué de l'œdème pulmonaire causant de la dyspnée et de l'hypoxémie peu de temps après l'administration [81]. Pour mieux comprendre la toxicité pulmonaire de l'eugénol, des chercheurs ont infusé 4 et 8 µl d'eugénol à des rats et ont par la suite observé de la détresse respiratoire aiguë et de l'œdème pulmonaire hémorragique chez les animaux traités. Histologiquement, il y avait de l'œdème périvasculaire et interstitiel dans les poumons ainsi que des globules rouges et des neutrophiles dans les espaces alvéolaires. De

plus, il y a avait une augmentation du contenu protéique dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire des animaux traités et celle-ci pouvait être partiellement prévenue par un traitement préalable avec des enzymes antioxydantes comme la catalase et la superoxyde dismutase, suggérant que les lésions pulmonaires sont attribuables, au moins en partie, à un dommage oxydatif [82].

Le deuxième article est une étude clinique de l'utilisation de l'eugénol pour l'anesthésie générale chez l'humain. Une solution de 5% d'eugénol a été utilisée par voie intraveineuse pour l'anesthésie dans le cadre de procédures diagnostiques de routine autant que pour des chirurgies majeures. Cliniquement, l'eugénol avait des effets sur le système respiratoire, induisant une stimulation respiratoire transitoire suivie d'une brève période d'apnée. Il n'y avait pas d'effet sur la fonction cardiaque. L'utilisation de l'eugénol comme anesthésique général a cependant été abandonnée puisqu'environ le tiers des patients développaient des thromboses veineuses au site d'injection [83].

### **Toxicité par application topique**

L'application topique d'huile de clou de girofle peut causer une anesthésie permanente et de l'anhidrose. Un rapport de cas fait état d'une femme de 24 ans ayant accidentellement renversé de l'huile de clou de girofle sur sa joue en tentant d'en appliquer sur une dent douloureuse. Près de 2 ans après l'incident, seule la douleur profonde était toujours perceptible dans la région infraorbitale et la peau était sèche à cet endroit à cause de l'absence de sudation [84]. Ces résultats suggèrent un effet toxique irréversible de l'eugénol sur les fibres nerveuses.

Finalement, l'application topique d'eugénol pour l'anesthésie de la grenouille *Xenopus* a été associée à de la nécrose cutanée [59].

### **Toxicité par inhalation**

Des cigarettes contenant du tabac et environ 30 à 40% de clou de girofle, communément appelées kreteks, sont très populaires en Indonésie et représentent la majorité des cigarettes fumées dans ce pays. Les kreteks ont été populaires aux États-Unis durant les années 1980

et ont été la cause de problèmes respiratoires graves chez certains usagers. La toxicité pulmonaire était caractérisée par de la détresse respiratoire, de l'œdème pulmonaire, des bronchospasmes et de l'hémoptysie. Une incidence accrue d'infections respiratoires et une exacerbation des signes d'asthme ou de bronchite chronique sont aussi rapportées [85]. L'instillation intratrachéale des différents constituants des cigarettes au clou de girofle (eugénol, acétate d'eugénol,  $\beta$ -caryophyllène et  $\alpha$ -humulène) à des rats indique que l'eugénol est le principal composé toxique des kreteks. Les lésions observées incluent de la congestion pulmonaire, des hémorragies, de l'emphysème et de l'œdème pulmonaire aigu. Il n'y a cependant pas de lésions histologiques lorsque la fumée de cigarettes au clou de girofle est administrée par inhalation à des hamsters [86].

### **Réactions allergiques**

En plus d'être utilisé comme anesthésique local pour diminuer les douleurs dentaires, l'eugénol est aussi utilisé dans les ciments et les ponts dentaires pour ses propriétés antiseptiques et anesthésiques, souvent en combinaison avec l'oxyde de zinc. Les principaux effets secondaires de ces utilisations chez l'humain impliquent des réactions de type allergique. Chez des patients ayant reçu un implant dentaire contenant de l'eugénol, une réaction allergique systémique incluant des démangeaisons et des papules ou plaques cutanées peut se produire dans les heures suivant la pose de l'implant [87]. La réaction allergique peut aussi ne pas être immédiate et se manifester en tant qu'urticaire chronique [88]. Il a été suggéré que ces réactions d'urticaire se produisent à cause de l'effet inhibiteur de la cyclooxygénase de l'eugénol, un mécanisme connu pour causer de l'urticaire avec plusieurs médicaments anti-inflammatoires [87]. En effet, l'aspirine a été associée à des réactions d'urticaire et d'angioedème depuis plus de 100 ans, et nous savons maintenant que ce phénomène est lié à l'inhibition de la cyclooxygénase par l'aspirine. La réaction d'urticaire serait principalement due à une surproduction de cystéinyl-leucotriènes, comme les leucotriènes  $C_4$ ,  $D_4$  et  $E_4$ , qui sont des médiateurs inflammatoires produits par les éosinophiles, mastocytes, neutrophiles, macrophages et cellules épithéliales. Leur

surproduction et leur relâche par les mastocytes est liée à la diminution des taux de PGE<sub>2</sub> résultant de l'inhibition de la cyclooxygénase par l'aspirine [89].

L'eugénol et l'huile de clou de girofle ont aussi été associés à un risque de développer des dermatites de contact chez les professionnels qui y sont exposés de façon chronique. Il peut alors se développer des plaques prurigineuses, vésiculeuses et érythémateuses au site de contact [90].

## Articles

Deux articles sont utilisés pour démontrer l'efficacité et la toxicité de l'eugénol administré à des doses anesthésiantes chez des grenouilles *Xenopus laevis* de différents poids corporels. Dans le premier article (*Eugenol Anesthesia in African Clawed Frogs (Xenopus laevis) of Different Body Weights*), nous évaluons l'efficacité sur des petites ( $7,5 \pm 2,1$  g) et moyennes ( $29,2 \pm 7,4$  g) grenouilles. Différents réflexes sont évalués suite à l'anesthésie et les fonctions respiratoire et cardiaque sont monitorées. L'efficacité de l'eugénol ayant déjà été démontrée sur des grosses grenouilles, le but de cette étude était de vérifier l'importance du poids corporel dans la réponse à l'anesthésie. Dans le deuxième article (*Evaluation of the toxicity of eugenol at anesthetic doses in African clawed frogs (Xenopus laevis)*), l'histopathologie est utilisée pour déterminer la toxicité chez des grenouilles de taille moyenne après une ou trois administrations ainsi que la réversibilité des changements après une semaine sans traitement. Une étude précédente sur des grosses grenouilles n'avait pas révélé de lésions reliées à l'eugénol, cependant la littérature scientifique suggérait que les reins, le foie, les poumons et le système de coagulation pouvaient être affectés par une intoxication involontaire ou expérimentale avec l'eugénol ou l'huile de clou de girofle.

# **Article 1: Eugenol Anesthesia in African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) of Different Body Weights**

Félix Goulet<sup>2</sup>, Pierre Hélie<sup>2</sup>, and Pascal Vachon<sup>1\*</sup>

Faculty of Veterinary Medicine, Departments of <sup>1</sup>Veterinary Biomedicine and

<sup>2</sup>Pathology and Microbiology, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

**Running title: Eugenol anesthesia in *Xenopus* frogs**

Goulet et al.

La version finale et définitive de cet article a été publiée dans: Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, Volume 49, Numéro 4, Pages 460-3, Mai 2010, par l'American Association for Laboratory Animal Science. Tous droits réservés.

© 2010

The final, definitive version of this paper has been published in: Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, Volume 49, Issue 4, Pages 460-3, May 2010, by the American Association for Laboratory Animal Science. All rights reserved. © 2010

Corresponding author:

Pascal Vachon

Faculty of Veterinary Medicine

Veterinary Biomedicine

3200 Sicotte

St-Hyacinthe

Québec Canada

J2S 7C6

**Abstract**

The objective of this prospective study was to determine the duration of anesthesia in *Xenopus laevis* frogs of different body weights relative to exposure time in a eugenol (350  $\mu\text{L/L}$ ) bath. Two groups of 5 female frogs each weighing  $7.5 \pm 2.1$  g (small frogs) or  $29.2 \pm 7.4$  g (medium frogs) were used. The acetic acid test (AAT), withdrawal reflex, righting reflex, heart rate, and blood oxygen saturation were used to evaluate CNS depression after eugenol bath administration. No responses to the AAT, withdrawal reflex, and righting reflex were seen for 1 h (small frogs) or 0.5 h (medium frogs) after immersion in a eugenol bath for 5 or 10 min, respectively. Oxygen saturation was not affected by anesthesia, but heart rate was depressed for as long as 1 h in both groups of frogs. Surgical anesthesia evaluated by using skin and abdominal incisions revealed that small frogs were anesthetized for a maximum of 15 min compared with 30 min in medium frogs. Frogs showed no ill effects 24 h after eugenol bath administration. These results suggest that body weight is an important parameter to consider when using a eugenol bath for anesthesia of *Xenopus* frogs.

## **Introduction**

Many drugs have been used as anesthetics in amphibians, including ketamine<sup>5</sup> and tiletamine combined with zolazepam,<sup>12</sup> anesthetic gases such as methoxyflurane and isoflurane administered topically or in a water bath,<sup>14,18,19</sup> intravenous injection or bath immersion of propofol, and intracoelomic injection of medetomidine or barbiturates.<sup>5,8,18,20</sup> All of these anesthetic drugs produce highly variable depth and duration of anesthesia.<sup>13</sup>

Recently we have shown that eugenol, a clove oil extract, can be used to anesthetize *Xenopus laevis* frogs; no toxicity was observed after a single administration.<sup>7</sup>

The primary goal of the current study was to determine the relationship between body weight and time of exposure to the eugenol bath to produce comparable levels of anesthesia in *Xenopus laevis* frogs. Here we evaluated 2 groups of frogs (small and medium in size); data from large frogs in a previous study<sup>7</sup> were used for comparison.

## **Material and Methods**

### Animal subjects

Two groups of 5 female *Xenopus laevis* frogs (Xenopus I, Dexter, MI) each weighing  $7.5 \pm 2.1$  g (small frogs) or  $29.2 \pm 7.4$  g (medium frogs) were used. Frogs were housed in polycarbonate cages (40 cm  $\times$  20 cm  $\times$  15 cm; Ancare, Bellmore, NY) filled with purified water (more than 2 L per frog). The water was obtained from the university water treatment (activated charcoal and UV) system. Water-quality parameters were: pH, 6.8 to 7.3; no chlorine or chloramines; ammonia, 0.2 mg/mL (normal value, 0.4 to 0.6 mg/mL); no nitrites (normal value,  $< 1$  mg/mL); no hardness (normal value, 70 to 150 mg/mL), and no copper (all PVC tubing). Water and room temperatures were kept at  $21 \pm 2$  °C at all times. Every 2 d the water was changed and the containers were cleaned. Animals were fed every other day with commercial *Xenopus* food (Xenopus Express, Brooksville, FL). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use and

is in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.<sup>2</sup> Eugenol (purity, 99%) was purchased from Sigma (St Louis, MO).

#### Evaluation of anesthesia depth

For the immersion bath, a 350- $\mu$ L/L (0.35 mL in 1 L purified water) eugenol solution was used.<sup>7</sup> Approximately 200 mL of this preparation was placed in a metal container (diameter, 15 cm; depth, 10 cm). Each frog was immersed in this solution for 5 min (small frogs) or 10 min (medium frogs). The container was covered so that frogs were in full darkness for the induction period. After the immersion bath, frogs were rinsed thoroughly with purified water and placed into polycarbonate cages containing purified water (depth, 0.5 to 1 cm). Frogs were rinsed periodically to keep their skin moist.

Five different tests of anesthesia depth were used to assess the effect of eugenol in all frogs: the acetic acid test (AAT), righting reflex, withdrawal reflex, heart rate, and oxygen saturation. Animals were tested at 15 min before and 0, 15, and 30 min and 1, 2, and 3 h after the eugenol bath.

Frogs were assessed first by using the AAT, which is an indicator of analgesia depth.<sup>16</sup> This test involves application of single drops of incrementally increasing concentrations of acetic acid to the dorsum of the frog's thigh or leg. The volume was controlled by using an automatic pipette set to deliver 20  $\mu$ L. Five concentrations of AA (0%, 5%, 10%, 20%, 50%) were tested. After a contact time of 1 to 2 s, the tested skin area was rinsed thoroughly with purified water. The test was considered positive if the frog exhibited the wiping response, which is a motor reflex where the frog dislodges the drop by using its other leg.<sup>7</sup> If no reaction was observed, the next higher concentration of AA was applied, alternating between right and left thighs. The test was considered positive if the animal reacted to at least the 5% AA solution; no other concentration was tested. The righting and withdrawal reflexes were evaluated also. The withdrawal reflex was tested by pinching one phalangeal articulation of the pelvic limb with surgical forceps for a maximum of 2 s. The righting reflex was evaluated as the animal's ability to turn to its ventrum when placed on its back. Heart rate and oxygen saturation were measured by using a pulse oximeter

(CANL425V, Med Associates, St Alban, VT). For the cardiovascular parameters, frogs were placed in a sternal position, and the probe was placed under the sternum.

#### Evaluation of surgical anesthesia

Two weeks after evaluation of anesthesia by using the AAT and righting and withdrawal reflexes, the same frogs were used to evaluate depth and duration of surgical anesthesia. Skin incisions were made in 3 frogs at 15 min after eugenol bath immersion (5 min and 10 min in the small and medium frogs, respectively); abdominal muscle incisions were made in 2 frogs at 30 min after immersion. Animals were monitored only for overt reaction to the incision.

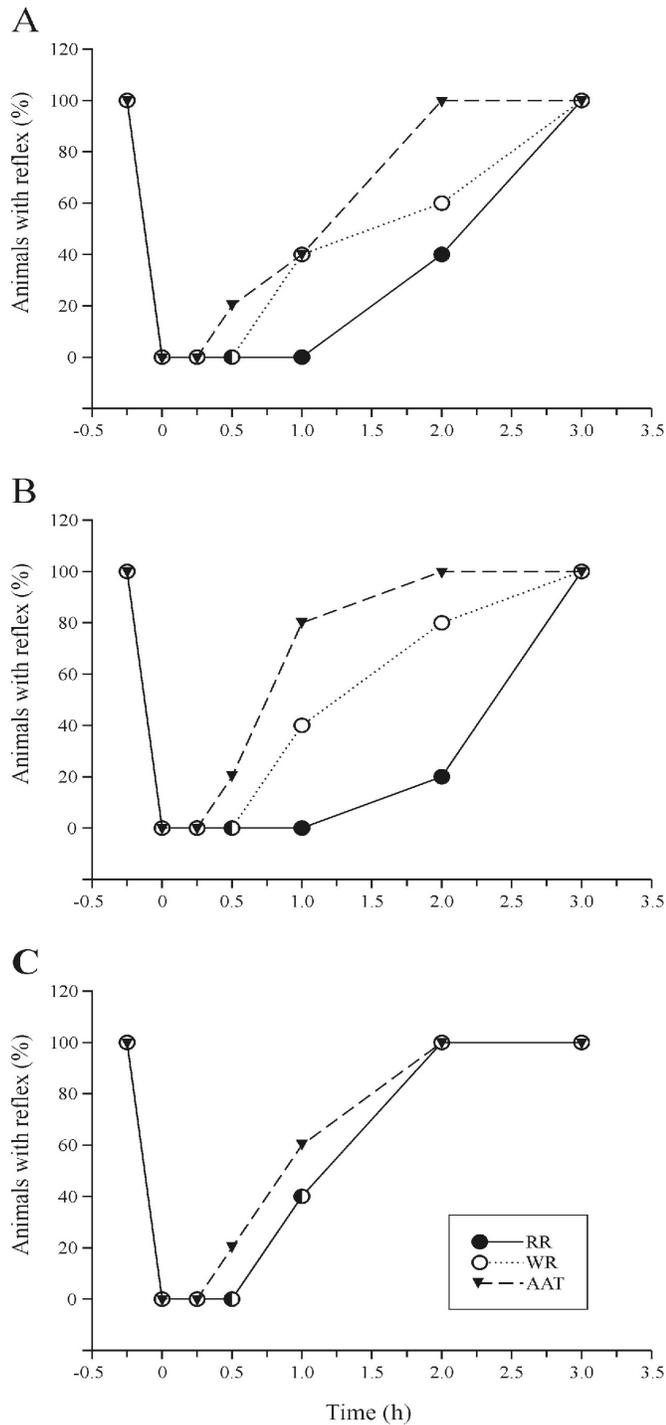
#### Statistics

Heart rate and oxygen saturation data were analyzed statistically (SAS version 8.2, SAS Institute, Cary, NC) by using the repeated-measures linear model with time as a within-subject factor. Statistical significance was set at a *P* value of less than 0.05.

#### **Results**

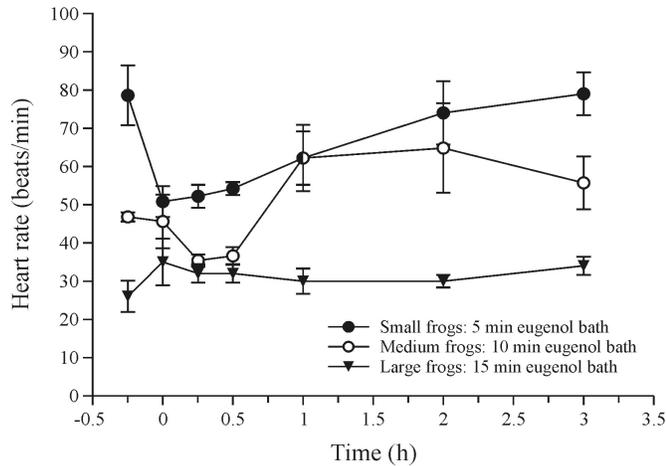
To evaluate anesthesia of *Xenopus* frogs by bath immersion in eugenol solution, we compared our results from small ( $7.5 \pm 2.1$  g) and medium ( $29.2 \pm 7.4$  g) frogs with findings from a previous study<sup>7</sup> using large frogs ( $111.7 \pm 18.3$  g); however, oxygen saturation was not evaluated in large frogs.

After bath immersion, all frogs showed marked loss of muscle tone. A nociceptive response to the AAT was absent for at least 0.5 h in all frogs (Figure 1). The withdrawal reflex was seen in all groups (2 of 5 frogs per group) at 1 h after bath administration. The righting reflex returned later than did the withdrawal reflex in all small and medium frogs, whereas it occurred at the same time as the AAT response in large frogs.<sup>7</sup> Therefore the AAT appears to be the most sensitive of the 3 noninvasive tests used to monitor depth of anesthesia.

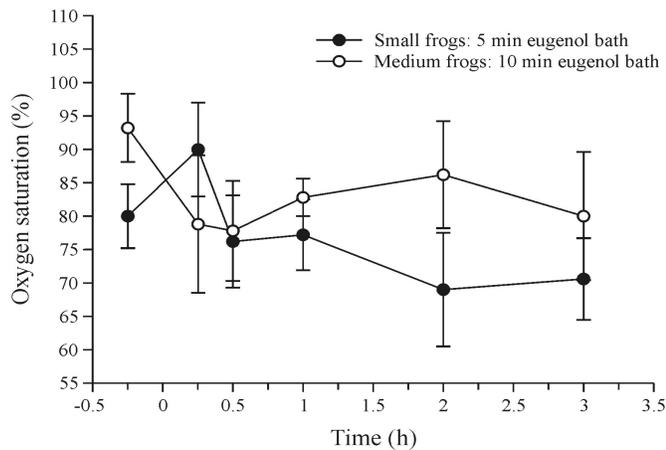


**Figure 1.** Percentage of *Xenopus laevis* frogs that responded to the acid acetic test (AAT), withdrawal reflex (WR), and righting response (RR) as a function of time and different exposure times to a eugenol bath (350  $\mu\text{L/L}$ ). Results for (A) small, (B) medium, and (C) large frogs<sup>14</sup> ( $n = 5$  per group) after immersion in eugenol solution for 5, 10, or 15 min, respectively. Time  $-0.25$  h ( $-15$  min), baseline values prior to the eugenol bath immersion; time 0, results obtained immediately after bath immersion.

Eugenol had a depressant effect ( $P < 0.02$ ) on heart rate at 0, 15, and 30 min in small frogs (Figure 2). Heart rate then slowly recovered to baseline values. Heart rate was decreased also in medium frogs at 15 ( $P < 0.02$ ) and 30 min ( $P < 0.05$ ) but was at baseline at 1, 2, and 3 h after immersion. Eugenol had no effect on heart rate in large frogs<sup>7</sup> or on oxygen saturation in small and medium frogs (Figure 3; no data available for large frogs).



**Figure 2.** Heart rate (mean  $\pm$  SE) before and after immersion of small and medium *Xenopus laevis* frogs ( $n = 5$  per group) in a solution of eugenol ( $350 \mu\text{L/L}$ ). Time  $-0.25$  h ( $-15$  min), baseline values prior to the eugenol bath immersion; time 0, results obtained immediately after bath immersion.



**Figure 3.** Oxygen saturation (mean  $\pm$  SE) measured with a pulse oximeter before and after immersion of small and medium *Xenopus laevis* frogs ( $n = 5$ /group) in a solution of eugenol ( $350 \mu\text{L/L}$ ). Time  $-0.25$  h ( $-15$  min), baseline values prior to eugenol bath immersion; time 0, results obtained immediately after bath immersion.

No animal showed signs of ill health at 24 h after anesthesia. A single small frog showed vomiting (with food expulsion) and abdominal contractions at the end of anesthesia. Two weeks after these evaluations, depth and duration of surgical anesthesia, evaluated by inducing skin and abdominal muscle incisions, were evaluated in these same frogs. Whereas 3 small frogs reacted to incisions made at 15 min, the other 2 reacted at 30 min; all medium frogs reacted to incisions made at 30 min after immersion. Frogs that were incised at 15 min started to move spontaneously at 30 min. On awakening, frogs immediately were placed in a eugenol bath for 20 min to avoid pain and distress until euthanasia was achieved (no heart rate detected).

### **Discussion**

Procedures using eugenol anesthesia in *Xenopus laevis* frogs should be performed within 15 min in small frogs ( $7.5 \pm 2.1$  g) and 30 min in medium ( $29.2 \pm 7.4$  g) or large frogs ( $111.7 \pm 18.3$  g) when administered by immersion at a concentration of  $350 \mu\text{L/L}$  for 5, 10, or 15 minutes in small, medium or large frogs respectively. These recommendations are made in light of the frogs' responses to skin and abdominal incisions. Among the reflexes evaluated, AAT was the most sensitive noninvasive test to determine anesthesia depth. Analgesia evaluated with the AAT lasted 30 min in all frogs and therefore cannot be used as an anesthesia indicator in small frogs, since the surgical anesthesia lasted only 15 min, but seems acceptable for medium and large frogs. Eugenol decreased heart rate in small and medium but not large<sup>7</sup> frogs and had no significant effect on oxygen saturation. However, in small frogs, the average heart rate decreased from approximately 80 to 50 bpm and the average oxygen saturation from 93% to 67%; these values suggest eugenol has a marked cardiovascular depressive effect. Although our frogs recuperated well from eugenol anesthesia, small frogs should receive supportive care. Our results suggest that eugenol bath immersion for anesthesia should take into account the weight of the animal, which is related to body surface and drug absorption. In addition, perhaps other drugs administered to frogs by means of bath immersion should be evaluated with animals of different body weights.

Oil of cloves (*Eugenia caryophyllata*) has been used to anesthetize *Rana pipiens* frogs.<sup>6,10</sup> Eugenol is a main constituent of clove oil and can be used to anesthetize frogs by immersing them in an eugenol (350  $\mu\text{L/L}$ ) solution for 15 min.<sup>7</sup> Eugenol decreased respiratory rate in a previous study,<sup>5</sup> but this parameter was not evaluated in the present study. Surgical anesthesia, evaluated by inducing an abdominal incision, was confirmed for approximately 30 min in large frogs.<sup>7</sup> Eugenol can be purchased in near-pure form, thus enabling controlled administration of a single anesthetic substance, unlike the situation with clove oil, which may contain additional active substances, such as methyl eugenol. Other routes of administration (patch application, intracoelomic, subcutaneous, and into lymph sacs) of eugenol have not successfully induced surgical anesthesia in *Xenopus laevis*.<sup>7</sup> The analgesic and anesthetic effects can be explained by its effects on central nervous system receptors. Eugenol blocks both sodium voltage-gated channels ( $\text{NA}_V1.7$  and  $\text{NA}_V1.8$ )<sup>3</sup> as well as the vanilloid receptor TRPV1,<sup>21</sup> all of which are implicated in the transmission of painful stimuli. Eugenol also activates the inhibitory channel GABA A<sup>1</sup> which is responsible for the central nervous system depression effect similarly to most anesthetics. These properties explain our findings and argue against the proposition that eugenol is a muscle paralytic drug.

In a previous study, *Rana pipiens* were tested with 3 different drugs: medetomidine, propofol, and clove oil.<sup>10</sup> Medetomidine was injected intramuscularly, propofol perivascularly into the sublingual plexus area, and an anesthetic bath of clove oil was prepared. Medetomidine failed to induce sedation, and the authors suggested that it should be excluded as a potential analgesic drug in amphibians.<sup>7</sup> Perivascular administration of propofol (10 mg/kg) rapidly induced sedation in frogs, but surgical anesthesia was never obtained.<sup>7</sup> Intracoelomic administration of propofol (30 mg/kg) may yield adequate anesthesia, but this result was obtained in only a single *Pelodytes caerulea* frog.<sup>18</sup> Immersion in a propofol bath (75 mg/L) provided both sedation and chemical restraint, although with highly variable duration and depth of the anesthesia.<sup>6</sup> Tricaine methanesulfonate and benzocaine are also useful drugs for anesthetizing frogs.<sup>4,6</sup> Tricaine methanesulfonate is a water-soluble acid salt that has been successfully used to

immobilize and anesthetize amphibians. Erythema of thinly skinned areas, such as the ventrum, occurs during anesthetic induction with tricaine methanesulfonate. If complications arise, frogs should be rinsed with well-oxygenated water. Tricaine methanesulfonate also can be administered intracoelomically and into the dorsal lymph sacs.<sup>9,11</sup> A solution of 0.02% to 0.03% benzocaine can be used to achieve surgical anesthesia in amphibians.<sup>15,17</sup> To achieve this concentration, benzocaine must first be dissolved in ethanol. Another method is to apply a 20% benzocaine cream (Orajel, Del Laboratories, Morris Plains, NJ) topically.<sup>20</sup> Benzocaine will immobilize frogs and anesthetize 50% of the animals for approximately 15 min.<sup>6</sup>

Other drugs have been used to anesthetize frogs with variable success. Ketamine hydrochloride has been used with highly variable results in amphibians.<sup>20</sup> Recovery may require 12 to 18 h. Tiletamine administered at 20 mg/kg<sup>12</sup> does not provide analgesia, and recovery may take up to 32 h. Neither drug is recommended as first-choice anesthetic. Pentobarbital administered at 30 to 60 mg/kg intracoelomically will provide a moderate level of surgical anesthesia.<sup>9</sup> Responses are variable between species, and caution should be used if pentobarbital is used for anesthesia.<sup>20</sup> Anesthesia induction and maintenance with methoxyflurane,<sup>19</sup> halothane<sup>20</sup> and isoflurane<sup>14</sup> is accomplished by bubbling the gas through water, by intubation, or by direct application of these anesthetics to the skin. Anesthetic saturation of 2% to 5% promotes surgical anesthesia within 20 min but is highly variable. In conclusion, eugenol appears to be a good choice for anesthesia in frogs. This agent is inexpensive, relatively nontoxic, and effective. Our results suggest that body weight is an important parameter to consider when using a eugenol bath for the anesthesia of *Xenopus* frogs. The relationship of anesthetic depth and duration to body weight warrants further investigation. Young, small frogs clearly differ in body surface area but may also differ in drug metabolism, skin permeability, and other factors that might alter eugenol's pharmacokinetics relative to those in older, larger frogs.

### **Acknowledgment**

We thank Marie-Thérèse Parent for preparation of the figures.

## References

1. Aoshima H, Hamamoto K. 1999. Potentiation of GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:743–748.
2. Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals, vol 1, 2nd ed. Ottawa (Canada): Canadian Council on Animal Care.
3. Cho JS, Kim TH, Lim JM, Song JH. 2008. Effects of eugenol on Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1243:53–62.
4. Downes U. 1995. Tricaine methanesulfonate in amphibian: a review. *Bull Assoc Reptil Amphib Vet* 5:11–16.
5. Green CJ. 1979. Classes Amphibia, Reptilia, and Aves, p 111–113. In: *Animal anesthesia. Laboratory animal handbook* 8. London (UK): Laboratory Animals.
6. Guénette SA, Lair S. 2006. Anesthesia of the leopard frog, *Rana pipiens*: a comparative study between 4 different agents. *J Herpetol Med Surg* 16:38–44.
7. Guénette SA, Hélie P, Beaudry F, Vachon P. 2007. Eugenol for anaesthesia of African clawed frogs (*Xenopus leavis*). *Vet Anaesth Analg* 34:164–170.
8. Guénette SA, Beaudry F, Vachon P. 2008. Anesthetic properties of propofol in African clawed frogs (*Xenopus leavis*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 45:35–38.
9. Kaplan HM. 1969. Anesthesia in amphibians and reptiles. *Fed Proc* 28:1541–1546.
10. Lafortune M, Mitchell MA, Smith JA. 2001. Evaluation of medetomidine, clove oil, and propofol for anesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*. *J Herpetol Med Surg* 11:13–18.
11. Letcher J. 1992. Intracoelomic use of tricaine methanesulfonate for anesthesia of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) and leopard frogs (*Rana pipiens*). *Zoo Biol* 11:243–251.
12. Letcher J, Durante R. 1995. Evaluation of use of tiletamine–zolazepam for anesthesia of bullfrogs and leopard frogs. *J Am Vet Med Assoc* 207:80–82.

13. Mader DR. 1996. Amphibian husbandry and medicine, p 436–459. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia (PA): WB Saunders.
14. Smith JM, Stump KC. 2000. Isoflurane anesthesia in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Contemp Top Lab Anim Sci* 39:39–42.
15. Stetter MD. 2001. Fish and amphibian anesthesia. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 4:69–82, vii.
16. Stevens CW. 1992. Alternative to the use of mammals for pain research. *Life Sci* 50:901–912.
17. Vanable JJ. 1985. Benzocaine: an excellent amphibian anesthetic. *Axolotol Newslett* 14:19–21.
18. Von Esse FV, Wright KM. 1974. Effect of intracoelomic propofol in White's tree frogs, *Pelodryas caerulea*. *Bull Assoc Reptil Amphib Vet* 9:7–8.
19. Wass JA, Kaplan HM. 1974. Methoxyflurane anesthesia for *Rana pipiens*. *Lab Anim Sci* 24:669–671.
20. Wright KM. 1996. Amphibian husbandry and medicine. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia (PA): WB Saunders.
21. Yang BH, Piao ZG, Kim YB, Lee CH, Park K, Kim JS, Oh SB. 2003. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J Dent Res* 82:781–785.

**Article 2: Evaluation of the toxicity  
of eugenol at anesthetic doses in  
African clawed frogs (*Xenopus  
laevis*)**

Goulet F<sup>1</sup>, Vachon P<sup>2</sup>, Hélie P<sup>1</sup>.

Departments of Pathology & Microbiology<sup>1</sup> and Veterinary Biomedicine<sup>2</sup>,  
Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Qc,  
Canada

**Running title: Eugenol toxicity in *Xenopus* frogs**

Goulet et al.

La version finale et définitive de cet article a été publié dans: Toxicologic Pathology, Volume 39, Numéro 3, Pages 471-7, Avril 2011, par SAGE Publications Ltd. / SAGE Publications, Inc. Tous droits réservés. © 2011

The final, definitive version of this paper has been published in Toxicologic Pathology, Volume 39, Issue 3, Pages 471-7, April 2011, by SAGE Publications Ltd. / SAGE Publications, Inc. All rights reserved. © 2011

Corresponding author:

Pierre Hélie

Faculty of Veterinary Medicine

Pathology & Microbiology

3200 Sicotte

St-Hyacinthe

Québec Canada

J2S 7C6

**Keywords:** Eugenol; Clove oil; *Xenopus laevis*; African clawed frog; Toxicity.

**Abstract**

Eugenol has been shown to induce anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). The toxicity of eugenol, administered at anesthetic doses, was evaluated in *Xenopus* frogs with an average body weight of  $28.2 \pm 13.7$  g. Frogs were immersed in 250 ml of an aqueous solution containing 350  $\mu\text{L/L}$  of eugenol for 10 minutes, and received a single administration (group 1, 12 animals) or 3 consecutive daily administrations (group 2, 12 animals). In each group, six frogs were scheduled to be euthanized the following day (subgroup A) and the other 6 were scheduled to be euthanized after a 1 week recovery period (subgroup B). Morphologic changes consistent with renal tubular apoptosis affecting distal tubules in the medulla were observed in all subgroup A animals, ranging from mild to moderate in group 1, and from mild to severe in group 2. In subgroup B, renal tubular regeneration was present in all but one animal examined. These findings suggest that eugenol toxicity in amphibians is first manifested by renal tubular apoptosis. Other eugenol-related lesions were massive hepatic necrosis in group 2 ( $n = 6$ ), hyaline membranes in the lung ( $n = 5$ ), and adipose tissue hemorrhages in group/subgroup 2B ( $n = 4$ ).

## Introduction

Eugenol (1-allyl-3-methoxy-4-hydroxybenzene) is the main constituent of the essential oil extracted from the dried flower buds of the clove tree (*Eugenia caryophyllata*). Clove essential oil contains approximately 88% eugenol; other compounds include eugenyl acetate, humulenol,  $\alpha$ -humulene,  $\beta$ -caryophyllene, calacorene, calamenene, 2-heptanone and ethyl hexanoate (Chaieb *et al.* 2007). Eugenol and clove oil have been used as local anesthetics in dentistry since the 17<sup>th</sup> century, specifically to reduce the pain associated with dental cavities (Curtis 1990). More recently, clove oil has been shown to be an effective, inexpensive and easy to use general anesthetic agent in numerous species of fish, crustaceans and mollusks. Clove oil is used in these species to reduce stress and its associated morbidity during transport and diagnostic or experimental procedures (Grush *et al.* 2004; Iversen *et al.* 2003; Keene *et al.* 1998; Soltani *et al.* 2004; Soto and Burhanuddin 1995; Walsh and Pease 2002; Waterstrat and Plnkham 2005; Woody *et al.* 2002). The potential of clove oil and eugenol as general anesthetic agents has also been tested in amphibians with promising results. Immersion of leopard frogs (*Rana pipiens*) in an aqueous solution containing 300  $\mu$ l/L of clove oil for 15 minutes induced surgical anesthesia in all frogs (Lafortune *et al.* 2001). Eugenol also induces general anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*), a species used in developmental biology, molecular biology and toxicity studies; immersion of female *Xenopus laevis* (90 to 140 g body weight) in an aqueous solution containing 350 mg/L of eugenol for 15 minutes provided surgical anesthesia for at least 30 minutes in most frogs. Selected tissues (heart, lungs, kidneys, liver, skin and eyes) were without histologic lesions 24 hours after eugenol anesthesia (Guenette *et al.* 2007). However, little is known about the toxic potential of eugenol in amphibians, especially with regard to multiple administrations and different body weights. The aim of the present study was to evaluate the toxicity of eugenol in medium-sized female African clawed frogs after a single or 3 consecutive daily administrations of eugenol at anesthetic levels, with or without a one week recovery period.

## **Material and methods**

### Animals

Thirty female *Xenopus laevis* frogs with an average body weight of  $28.2 \pm 13.7$  g were used (Xenopus 1; Dexter, MI, USA). Frogs were housed in polycarbonate cages measuring 40 x 20 x 15 cm (Ancare, Bellmore, NY, USA) filled with purified water (at least 2L per frog). The water was obtained from our facility's water treatment system (filtering through activated charcoal and UV treatment). Water and room temperatures were kept at  $21.2 \pm 2^\circ\text{C}$ . The following water parameters were recorded and all were within normal values: pH 6.8-7.3, no chlorine and chloramines, ammonia concentration 0.2 mg/ml (normal values 0.4 - 0.6 mg/ml), no nitrites (normal values  $< 1$  mg/ml), no hardness (normal values 70-150 mg/ml) and no copper (all PVC tubing). Water was changed and polycarbonate cages were cleaned every two days. Animals were fed every other day with commercial *Xenopus* food (Xenopus Express, Brooksville, FL, USA). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal prior to animal use, in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### Experimental design

Two groups of 12 frogs each were anesthetized with eugenol by bath immersion. Six frogs kept in water from the same source were used as controls. In group 1, animals received a single administration of eugenol, whereas in group 2, animals received three consecutive daily administrations of eugenol. Each group was further subdivided as follows; in subgroup A, animals were scheduled to be euthanized 24 hours after the last eugenol bath, whereas in subgroup B, animals were scheduled to be euthanized after a one week recovery period. Six control animals were used; two were euthanized every week, starting on day 1 of the experimental period.

### Bath immersion protocol

The concentration and exposure time to eugenol were selected based on a previously published study (Goulet *et al.* 2010) . An aqueous solution of eugenol was prepared by measuring 350 µl of eugenol (purity 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with a pipette and adding it to 1 L of purified water in a 1 L Pyrex glass bottle (Corning, Lowell, MA, USA). The solution was thoroughly agitated and 250 ml was immediately poured into a metal container. Each frog was individually placed in the metal container so it was completely immersed in the solution, and the container was covered so the animal was in full darkness. After a 10 minute immersion period, the frog was removed from the solution, thoroughly rinsed with purified water and placed in a water pan for the recovery period. The frogs were periodically sprayed with purified water during the recovery period to assure proper skin hydration. The frogs were monitored every 5 minutes for the presence of the righting reflex, and each frog was returned to its original enclosure when it was able to right itself after being placed on its back (positive righting reflex).

### Pathology

At the end of the experimental period, euthansia was performed on all frogs, including control animals, by decapitation following anesthesia with eugenol as previously described (Goulet *et al.* 2010). A complete necropsy was performed and the following organs were examined for the presence of gross changes and sampled: adipose tissue (coelomic fat bodies), bone with bone marrow (femur), brain, colon, eyes, gall bladder, heart, kidneys, liver (2 sections), lungs, oral mucosa, skeletal muscle (thigh), skin (ventral and dorsal), small intestine (3 sections), spleen, stomach, and urinary bladder. Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, routinely processed for histology, embedded in paraffin and sectioned at 4 µm. Histological slides were stained with hematoxylin, eosin, phloxin and saffron (HEPS).

## **Results**

### Clinical observations

Group 1 animals (single administration) were clinically normal and exhibited normal behavior throughout the study. The only observed side effect related to eugenol anesthesia was vomiting in 2 of the 12 animals during the anesthetic recovery phase. One frog in group 1B (single administration, 1 week recovery) was found dead in its aquarium on the fourth day following eugenol immersion. Marked post-mortem changes precluded any histologic examination of this animal. In group 2 (3 consecutive daily administrations), frogs showed depression, were reluctant to move and swam less vigorously than control animals from day 3 up to the end of the experimental period. In group 2A (3 administrations, no recovery), one animal was found dead on the scheduled date of euthanasia (day 2). In group 2B (3 administrations, 1 week recovery), 2 animals were found dead on the scheduled date of euthanasia (day 8). All control frogs remained clinically normal throughout the experimental period.

### Gross lesions

In groups 1A, 1B and 2A, no significant changes were observed during necropsy. In group 2B (3 administrations, 1 week recovery), 4 animals, including the 2 that had been found dead, had gross lesions in the liver, coelomic fat bodies and kidneys. In these animals, the liver was diffusely pale and irregularly mottled with yellowish and red areas; it was soft and friable on sectioning. There were multiple petechiae and hemorrhagic foci in the adipose tissue, predominantly in the coelomic fat bodies. There were occasional small red foci, < 1 mm in diameter on the surface of the kidneys. The other two frogs in group 2B did not have any gross changes. All control frogs were grossly unremarkable.

### Histopathology

The microscopic changes associated with the administration of eugenol in African clawed frogs are summarized in table I. Renal lesions were graded as follows : mild, <10% of tubules affected; moderate, 10-25% of tubules affected ; marked, 25-50% of tubules affected; severe, >50% of the tubules affected.

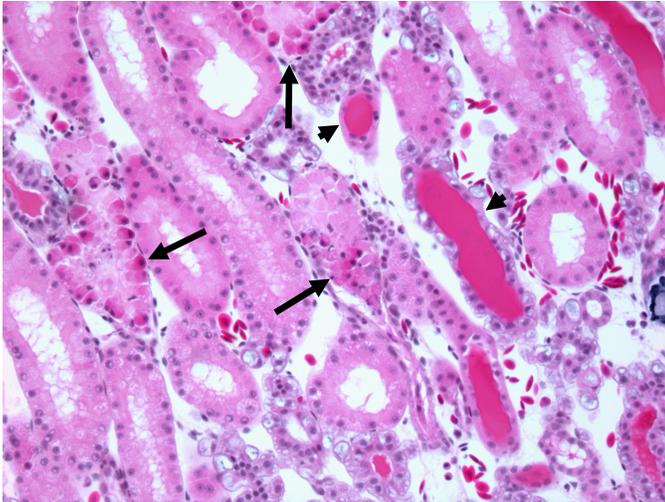
Table I. Summary of histologic lesions associated with single or repeated eugenol administrations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Number of frogs with histologic lesions (N/6).

	Subgroup A : Euthanasia after 24 hours	Subgroup B : Euthanasia after 1 week recovery
Group 1 : Single administration of eugenol	-Mild (4) to moderate (2) renal tubular apoptosis	-Renal tubular regeneration (5/5 <sup>a</sup> ) -Rare pulmonary hyaline membranes (1/5 <sup>a</sup> )
Group 2 : Three consecutive daily administrations of eugenol	-Mild (1), moderate (2), marked (1) or severe (2) renal tubular apoptosis -Massive hepatic necrosis (1) -Rare pulmonary hyaline membranes (1)	-Renal tubular regeneration (5) -Massive hepatic necrosis (5) -Multifocal adipose tissue hemorrhages (4) -Minimal to prominent pulmonary hyaline membranes (3)

<sup>a</sup> Marked post mortem changes precluded histologic examination in 1 frog found dead

In group 1A (single administration, 24 hr sacrifice), lesions were limited to the kidney. Lesions were morphologically consistent with apoptosis and involved distal tubules in the

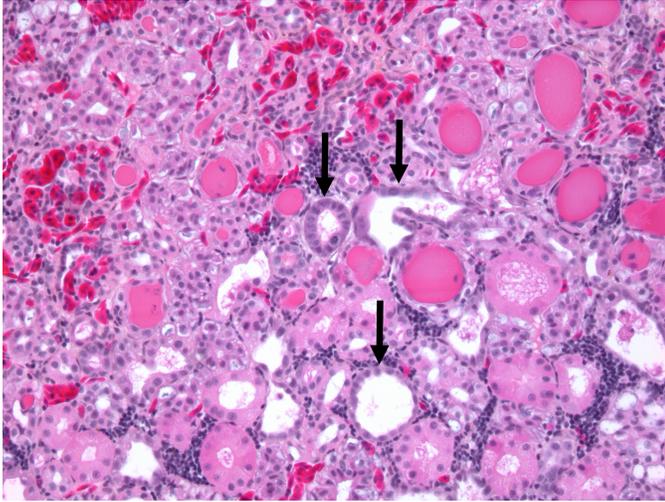
ventromedial zone (medulla); they were mild in 4 animals and moderate in 2 others. Affected tubules were lined by rounded epithelial cells, with hypereosinophilic cytoplasm and pyknotic, karyorrhectic or inapparent nuclei that were occasionally sloughed in tubular lumina (Fig. 1).



**Figure 1**

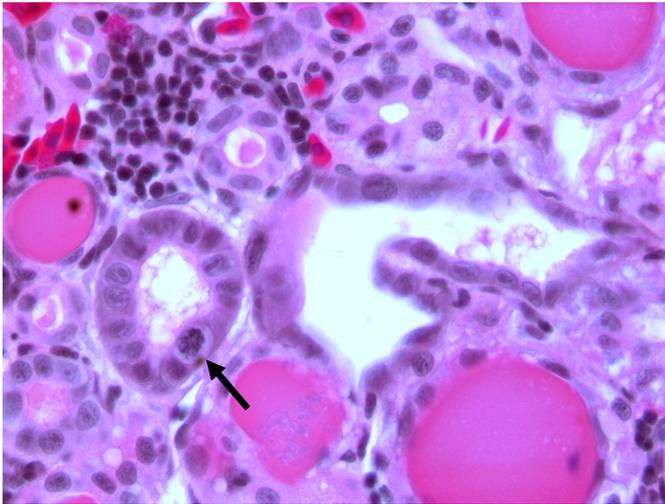
Renal tubular apoptosis in *Xenopus laevis* that received a single eugenol administration and was sacrificed at twenty-four hours. Apoptotic tubular epithelial cells are rounded with hypereosinophilic cytoplasm and pyknotic, karyorrhectic, or inapparent nuclei. The distal tubules are affected (arrows). Note the tubular proteinosis in less-affected tubules (arrowheads). Hematoxylin, eosin, phloxin, and saffron, 200X.

In group 1B (single administration, 1 week recovery), all 5 animals examined had evidence of renal tubular regeneration. Regenerating tubules were lined by attenuated to large epithelial cells with basophilic cytoplasm, vesicular nuclei with prominent nucleoli, and rare mitotic figures (Fig. 2). Interspersed between regenerating tubules, rare to occasional tubules exhibited features consistent with apoptosis. One animal also had a few hyaline membranes lining alveolar sacs and bronchioles. Hyaline membranes were composed of multifocal 20-40  $\mu\text{m}$  thick layers of eosinophilic fibrillar material admixed with rare cellular debris, macrophages and erythrocytes (Fig. 3).



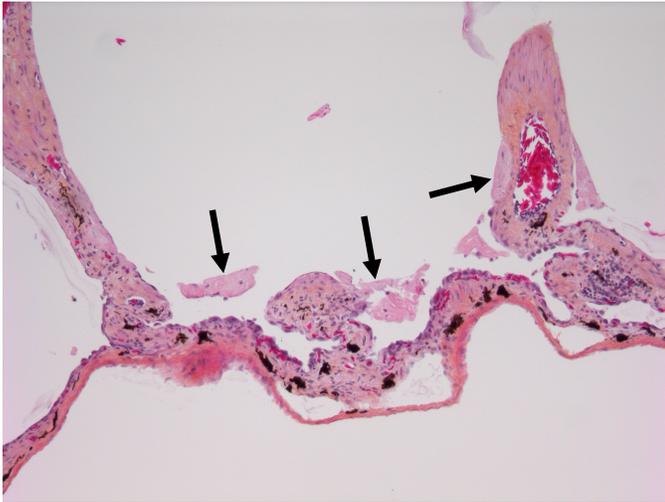
**Figure 2A**

Renal tubular regeneration in *Xenopus laevis* that received a single eugenol administration and had one week of recovery period. Regenerating epithelial cells are attenuated to large, with basophilic cytoplasm and vesicular nuclei (arrows). Tubular proteinosis is present. HEPS, 200X.



**Figure 2B**

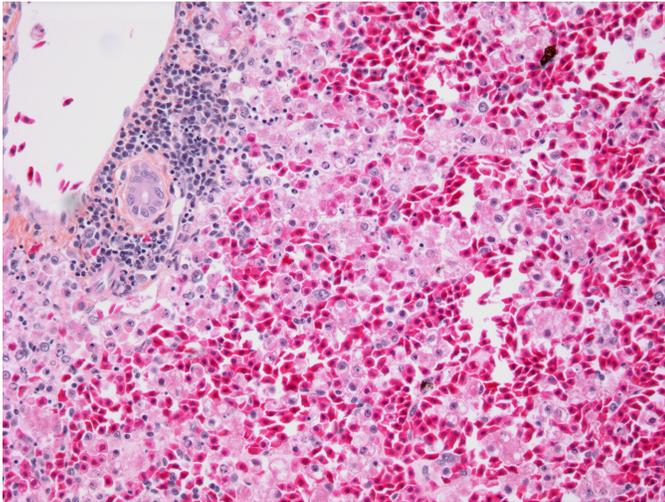
Higher magnification of Fig 2A. Note vesicular nuclei with prominent nucleoli. A mitotic figure is present (arrow). Hematoxylin, eosin, phloxin, and saffron, 630X.



**Figure 3**

Pulmonary hyaline membranes from *Xenopus laevis* that received a single eugenol administration and had one week of recovery prior to euthanasia. There is a hyaline membrane lining the wall of an alveolar sac (arrows). Hematoxylin, eosin, phloxin, and saffron, 100X.

In 5 out of 6 animals in group 2A (multiple administrations, 24 hr sacrifice), lesions were limited to the kidney and were morphologically consistent with tubular apoptosis. Renal lesions were mild (n = 1), moderate (n = 2), marked (n = 1) or severe (n = 2). In addition to severe tubular apoptosis, one animal (found dead) also had rare hyaline membranes in the lung and massive hepatic necrosis. Hepatic necrosis was characterized by diffuse disruption of hepatic cords with parenchymal collapse, and necrosis and loss of hepatocytes; necrotic hepatocytes were rounded, with vacuolated and pale cytoplasm and pyknotic, karyorrhectic or karyolytic nuclei (fig. 4).



**Figure 4**

Massive hepatic necrosis from *Xenopus laevis* that received 3 consecutive daily eugenol administrations and was sacrificed at 24 hr after last administration. There is diffuse disruption of hepatic cords with stromal collapse. Necrotic hepatocytes are rounded, dissociated and admixed with red blood cells. HEPS, 200X.

In group 2B (multiple administrations, 1 week recovery), renal tubular regeneration and hepatic necrosis were present in 5 animals. Hepatic necrosis was massive except in one frog in which large areas of necrosis were adjacent to unaffected areas. Mild to marked bile duct hyperplasia was present in all five frogs with hepatic necrosis. Consistent with the gross findings, hemorrhagic foci were seen histologically in the coelomic fat bodies of 4 animals. Hemorrhages were multifocal and random in distribution. Hyaline membranes were seen in the lungs of half the frogs from this group and varied from minimal to prominent. In affected animals, alveolar sacs were multifocally lined by cuboidal epithelial cells with intracytoplasmic eosinophilic globules. One frog had neither gross nor histologic lesions.

Two of the six control animals and 4 of the 23 treated animals examined had one to multiple visceral granulomas. Most granulomas measured 50-100  $\mu\text{m}$  but were occasionally up to 300  $\mu\text{m}$  in diameter, and consisted of discrete aggregates of histiocytes with fewer lymphocytes and rare heterophils and multinucleated giant cells. Most common locations were the liver and adipose tissue (coelomic fat bodies, retrobulbar and pericardial fat).

Periodic acid-Schiff, Ziehl-Neelsen and Gram stains did not reveal any microorganisms in the granulomas.

## **Discussion**

In this experiment, eugenol was shown to be toxic to African clawed frogs (*Xenopus laevis*) when administered at anesthetic dosage. The earliest lesion of eugenol toxicity was morphologically consistent with tubular apoptosis in the kidney, affecting the distal tubules of the medulla. The severity of the renal lesions increased with repeated administrations. These lesions appeared to be reversible, as evidenced by the presence of renal tubular regeneration after a recovery period (subgroup B). Furthermore, they were not associated with evidence of clinical disease in group 1 (single administration); in the latter, the only other lesion was minimal hyaline membrane formation, observed in the lung of a single subgroup B (recovery) frog. One frog from group 1B was found dead; the cause of death could not be established. As the recovery period for frogs in group 1B was only one week, we cannot extrapolate on long-term effects. Tubular apoptosis involved distal tubules and was mild to moderate; the lack of overt adverse reaction in affected frogs from group 1 suggests that the functional reserve of the kidney was not compromised (Sebastian *et al.* 2007). Pulmonary hyaline membranes were also observed in 4 frogs in group 2 (multiple administrations), more frequently in frogs with a recovery period. Other lesions associated with eugenol administration were generally massive hepatic necrosis and multifocal hemorrhages in adipose tissues; they only occurred in frogs with multiple administrations. These frogs had clinical signs and, in 3 cases, the lesions likely caused death. Granulomas were present in 6 animals, including 2 control and 4 treated animals. Since these lesions were present in both treated and control animals, they were interpreted as incidental findings and not related to treatment.

Rare cases of clove oil intoxication are reported in humans, mainly in children under two years of age. Clove oil is sold over the counter for the relief of toothache or as an

aromatherapy agent, and intoxications occur in children following accidental ingestion. Intoxication in children is usually manifested by central nervous system depression that can progress to coma, metabolic abnormalities including anion gap acidosis and hypoglycemia, severe hepatic failure, urinary abnormalities and coagulation deficits (Brown *et al.* 1992; Eisen *et al.* 2004; Hartnoll *et al.* 1993; Janes *et al.* 2005; Lane *et al.* 1991).

Urinary abnormalities occur with clove oil toxicity in children and include increased blood urea and creatinine levels, proteinuria and hematuria (Brown *et al.* 1992; Hartnoll *et al.* 1993; Janes *et al.* 2005; Lane *et al.* 1991). In one report, these changes were hypothesized to be the result of direct nephrotoxicity of unchanged eugenol (Lane *et al.* 1991). In our study, renal toxicity was the most consistent eugenol treatment-related lesion. Histological evidence of tubular apoptosis was present in all but one of the animals examined. The severity of the lesion was dose-related and the lesion was likely reversible, as evidenced by the presence of tubular regeneration after a 1 week recovery period. A diagnosis of acute tubular necrosis was considered; however, the morphological features of the lesion (cell rounding, hypereosinophilia, pyknosis and lack of inflammation) were more consistent with apoptosis (Kumar *et al.*, 2010). The mechanism of tubular apoptosis was not investigated and thus remains undetermined, although the apparent preservation of the basement membrane suggests nephrotoxicity more than ischemia (Maxie and Newman 2007). The exact segment of the nephron involved was identified as distal tubules; although, according to Wiechmann and Wirsig-Wiechmann, the affected tubules correspond to the thick limb of the loop of Henle (Wiechmann and Wirsig-Wiechmann 2003), most authors do not recognize the equivalent of this segment in amphibians.

Hepatic failure in human cases of clove oil toxicity is an early event and is evidenced by a marked increase in serum transaminase levels during the first 24 hours following ingestion of clove oil (Brown *et al.* 1992; Eisen *et al.* 2004; Hartnoll *et al.* 1993; Janes *et al.* 2005). This is in contrast with the present study, in which hepatocellular necrosis only occurred in animals that received three eugenol administrations. In man, the main pathway of eugenol

metabolism is the formation of conjugates with sulfate and glucuronide by the liver (Fischer *et al.* 1990). With overdose, the sulfate and glucuronide pathways are saturated and eugenol is conjugated with glutathione. Incubation of isolated rat hepatocytes with eugenol results in intracellular glutathione depletion which precedes hepatocellular death. Pretreatment of hepatocytes with N-acetylcysteine, which provides cysteine necessary for glutathione synthesis, significantly reduces intracellular glutathione loss and cell death, whereas pretreatment with glutathione-depleting drugs increases cytotoxicity of eugenol (Thompson *et al.* 1991). Moreover, in mice treated with eugenol by gavage, hepatotoxicity, characterized by extensive centrilobular necrosis, is only observed in animals pretreated with an inhibitor of glutathione synthesis (Mizutani *et al.* 1991). Pretreatment with cytochrome P450 inhibitors in these mice partially or completely prevented hepatotoxicity, whereas pretreatment with inducers of cytochrome P450 promoted hepatotoxicity (Mizutani *et al.* 1991). These results suggest that the hepatotoxicity of eugenol involves depletion of intracellular glutathione and loss of its protective antioxidant effect, and that subsequent hepatocellular damage is at least partly due to a cytochrome P450-dependant eugenol metabolite, probably a quinone methide (Thompson *et al.* 1998). This mechanism of toxicity is similar to what is observed in cases of acetaminophen toxicity, and a treatment regimen with N-acetylcysteine, similar to what is advocated in cases of acetaminophen poisoning, has been proposed in cases of eugenol intoxication (Hartnoll *et al.* 1993; Janes *et al.* 2005). In our study, hepatic toxicity was only seen in animals with multiple administrations, especially those allowed a recovery period. The distribution was massive in all but one case in which large areas were affected. Again, the exact mechanism of hepatotoxicity was not investigated.

Coagulopathy is often present in clove oil intoxications in infants and is usually manifested by an increase in prothrombin time (PT) (Brown *et al.* 1992; Eisen *et al.* 2004; Hartnoll *et al.* 1993; Janes *et al.* 2005). In one report, blood coagulation deficits were profound and were characterized by increased prothrombin ratio and activated partial thromboplastin ratio, thrombocytopenia, increased crosslinked fibrin degradation products

(XDP) and hematemesis, among other anomalies. This child also had fulminant hepatic failure and low levels of vitamin K-dependent coagulation factors (factors II, VII, IX and X) and the authors considered that the hepatic damage was the main cause of the coagulation deficits (Brown *et al.* 1992). In the present study, we observed multifocal hemorrhages in the coelomic fat bodies in frogs that had repeated eugenol administrations, all of which had concurrent massive hepatic necrosis, so liver lesions were the most likely cause of the hemorrhages in these animals. However, other mechanisms might have played a role in the development of hemorrhages. *In vitro* studies with rabbit and human platelets have demonstrated the antiplatelet aggregation activity of eugenol, which was at least partly due to the inhibition of cyclooxygenase-dependant formation of thromboxane A<sub>2</sub> (Chen *et al.* 1996; Raghavendra and Naidu 2009). Eugenol was found to be 29 times more effective than aspirin in inhibiting arachidonic acid-induced platelet aggregation (Raghavendra and Naidu 2009).

The pulmonary toxicity of clove oil and eugenol has been reported in human and in animals. Non-cardiogenic pulmonary edema and acute respiratory distress were observed in a 32 year old woman who voluntarily administered herself an intravenous dose of clove oil (Kirsch *et al.* 1990). Intravenous infusion of eugenol in adult male Sprague-Dawley rats caused acute lung injury of rapid onset, characterized by perivascular and interstitial edema and extravasation of erythrocytes and neutrophils in alveolar spaces. Furthermore, intravenous eugenol caused an increase in the protein content of the bronchoalveolar lavage fluid of treated rats, which was decreased with pre-treatment of rats with the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase. These findings suggest that eugenol-induced lung injury is at least in part mediated through an oxidative mechanism (Wright *et al.* 1995). Pulmonary toxicity possibly associated with smoking clove cigarettes has also been reported to the Centers for Disease Control (CDC). Severely affected individuals experienced acute respiratory distress, pulmonary edema, bronchospasm and hemoptysis (CDC 1985). When administered by intratracheal instillation to F344 rats, eugenol was found to be more toxic than other constituents of cloves. Pulmonary changes

in these rats included congestion, hemorrhages, acute emphysema and pulmonary edema. It was also concluded that when administered to rats by intratracheal instillation, eugenol is at least 200 times more toxic than when administered by gavage (LaVoie *et al.* 1986). In the present study, pulmonary hyaline membranes were always concomitant with renal lesions of at least moderate severity and mostly occurred after repeated administrations. Hyaline membranes were present only in one animal after a single administration and a one-week recovery period, and these lesions were minimal. Although the pulmonary lesions could represent a direct damage to alveolar epithelium and/or endothelium induced by eugenol or one of its metabolites, we cannot exclude the possibility that they are secondary to the renal lesions. In mammals, uremia is one of the known causes of diffuse alveolar damage (Husain 2010); we did not find any reference stating renal failure could cause alveolar damage in amphibians. In group 2B, most animals with hyaline membranes had some regions of the lungs where alveolar sacs were lined by cuboidal epithelial cells with intracytoplasmic hyaline globules. We interpreted these as being a regenerative attempt from the damaged pneumocytes lining the alveolar sacs. However, this change could not qualify as type II pneumocyte hyperplasia, since ultrastructural studies have demonstrated that amphibians lack type II pneumocytes (Meban 1973).

The only reported eugenol-related toxic lesion in amphibians is a case of cutaneous necrosis in African clawed frogs following topical application using a eugenol-soaked gauze (Ross *et al.* 2006). In large size *Xenopus laevis* female frogs (90 to 140 g), no histologic changes were observed following a single immersion of frogs in a solution containing 350mg/ml eugenol for 15 minutes (Guenette *et al.* 2007). These results differ from the present study, in which renal tubular apoptosis was present in all animals and mild pulmonary hyaline membranes were present in one animal after a recovery period, following a single administration of eugenol at a similar concentration and for a shorter period of time (10 minutes instead of 15 minutes). These results suggest that smaller frogs are more susceptible to the toxic effects of eugenol, and that the therapeutic index of eugenol in amphibians may be related to metabolic maturity. The half-life of eugenol is

relatively long in amphibians (4 hours), which may allow for the accumulation of this lipophilic compound and the development of greater toxicity after consecutive daily administrations (Guenette *et al.* 2007). Additional studies are needed to determine adequate concentration and time of exposure to an eugenol solution that are both safe and effective for the anesthesia of African clawed frogs of different body weights. To our knowledge, the present study constitutes the first comprehensive evaluation of the toxicity of eugenol in amphibians.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Jacinthe Cardin, Josée Letellier, Nancy Veilleux, Louise Cossette and Maria Paula Colas Ramirez for their excellent technical assistance and Marco Langlois for the preparation of the figures.

## References

- Brown, S. A., Biggerstaff, J., and Savidge, G. F. (1992). Disseminated intravascular coagulation and hepatocellular necrosis due to clove oil. *Blood Coagul Fibrinolysis* **3**, 665-8.
- CDC (1985). Epidemiologic Notes and Reports Illnesses Possibly Associated with Smoking Clove Cigarettes. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **34**, 297-9.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., and Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother Res* **21**, 501-6.
- Chen, S. J., Wang, M. H., and Chen, I. J. (1996). Antiplatelet and calcium inhibitory properties of eugenol and sodium eugenol acetate. *Gen Pharmacol* **27**, 629-33.
- Curtis, E. K. (1990). In pursuit of palliation: oil of cloves in the art of dentistry. *Bull Hist Dent* **38**, 9-14.
- Eisen, J. S., Koren, G., Juurlink, D. N., and Ng, V. L. (2004). N-acetylcysteine for the treatment of clove oil-induced fulminant hepatic failure. *J Toxicol Clin Toxicol* **42**, 89-92.
- Fischer, I. U., von Unruh, G. E., and Dengler, H. J. (1990). The metabolism of eugenol in man. *Xenobiotica* **20**, 209-22.
- Goulet, F., Hélie, P., and Vachon, P. (2010). Eugenol Anesthesia in African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) of Different Body Weights. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **49**, 460-3.

Grush, J., Noakes, D. L., and Moccia, R. D. (2004). The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish* **1**, 46-53.

Guenette, S. A., Helie, P., Beaudry, F., and Vachon, P. (2007). Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet Anaesth Analg* **34**, 164-70.

Hartnoll, G., Moore, D., and Douek, D. (1993). Near fatal ingestion of oil of cloves. *Arch Dis Child* **69**, 392-3.

Husain, A.N. (2010). The Lung. In Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Eighth edition (V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, J.C. Aster, eds.), p. 681, Saunders Elsevier, Philadelphia.

Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S., and Eliassen, R. A. (2003). The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S(TM) and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* **221**, 549-66.

Janes, S. E., Price, C. S., and Thomas, D. (2005). Essential oil poisoning: N-acetylcysteine for eugenol-induced hepatic failure and analysis of a national database. *Eur J Pediatr* **164**, 520-2.

Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D., and Soto, C. G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* **29**, 89-101.

Kirsch, C. M., Yenokida, G. G., Jensen, W. A., Wendland, R., Suh, H., and Bourgault, M. (1990). Non-cardiogenic pulmonary oedema due to the intravenous administration of clove oil. *Thorax* **45**, 235-6.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. (2010). Cellular Responses to Stress and Toxic Insults: Adaptation, Injury, and Death. In Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Eighth edition (V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, J.C. Aster, eds.), pp. 25-27, Saunders Elsevier, Philadelphia.

Lafortune, M., Mitchell, M., and Smith, J. (2001). Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*. *J Herpetol Med Surg* **11**, 13-8.

Lane, B. W., Ellenhorn, M. J., Hulbert, T. V., and McCarron, M. (1991). Clove oil ingestion in an infant. *Hum Exp Toxicol* **10**, 291-4.

LaVoie, E. J., Adams, J. D., Reinhardt, J., Rivenson, A., and Hoffmann, D. (1986). Toxicity studies on clove cigarette smoke and constituents of clove: determination of the LD50 of eugenol by intratracheal instillation in rats and hamsters. *Arch Toxicol* **59**, 78-81.

Maxie, M. G., and Newman, S. J. (2007). Acute tubular necrosis. In Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Fifth edition (M.G. Maxie, ed.), Vol. 2, pp. 466-8, Elsevier, Philadelphia).

Meban, C. (1973). The pneumonocytes in the lung of *Xenopus laevis*. *J Anat* **114**, 235-44.

Mizutani, T., Satoh, K., Nomura, H., and Nakanishi, K. (1991). Hepatotoxicity of eugenol in mice depleted of glutathione by treatment with DL-buthionine sulfoximine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **71**, 219-30.

Raghavendra, R. H., and Naidu, K. A. (2009). Spice active principles as the inhibitors of human platelet aggregation and thromboxane biosynthesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **81**, 73-8.

Ross, A., Guenette, S. A., Helie, P., and Vachon, P. (2006). Case of cutaneous necrosis in African clawed frogs *Xenopus laevis* after the topical application of eugenol. *Can Vet J* **47**, 1115-7.

Sebastian, M.M., Baskin, S.I., Czerwinski, S.E. (2007). Renal toxicity. In *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles* (R.C. Gupta, ed.), pp. 165-6, Elsevier-Academic Press, Oxford, U.K.

Soltani, M., Marmari, G. H., and Mehrabi, M. R. (2004). Acute Toxicity and Anesthetic Effects of Clove Oil in *Penaeus semisulcatus* under Various Water Quality Conditions. *Aquac Int* **12**, 457-66.

Soto, C. G., and Burhanuddin (1995). Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* **136**, 149-52.

Thompson, D. C., Barhoumi, R., and Burghardt, R. C. (1998). Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. *Toxicol Appl Pharmacol* **149**, 55-63.

Thompson, D. C., Constantin-Teodosiu, D., and Moldeus, P. (1991). Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* **77**, 137-47.

Walsh, C. T., and Pease, B. C. (2002). The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). *Aquac Res* **33**, 627-35.

Waterstrat, P. R., and Plnkham, L. (2005). Evaluation of Eugenol as an Anesthetic for the American Lobster *Homerus americanus*. *J World Aquac Soc* **36**, 420-4.

Wiechmann, A. F., and Wirsig-Wiechmann, C. R. (2003). Color Atlas of *Xenopus laevis* Histology. Kluwer Academic, Norwell.

Woody, C. A., Nelson, J., and Ramstad, K. (2002). Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J Fish Biol* **60**, 340-7.

Wright, S. E., Baron, D. A., and Heffner, J. E. (1995). Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. *J Lab Clin Med* **125**, 257-64.

## Efficacité anesthésique de l'eugénol

### Importance du poids corporel

Dans le premier article, nous avons démontré l'importance de tenir compte du poids corporel lors de l'anesthésie à l'eugénol chez la grenouille *Xenopus laevis*. En effet, avec une concentration fixe de 350 µL/L, le temps nécessaire pour induire un niveau d'anesthésie similaire chez des petites, moyennes et grandes grenouilles était de 5, 10 et 15 minutes respectivement [16].

Il est connu que différents paramètres peuvent influencer la réponse à l'anesthésie chez les amphibiens, comme l'espèce, le stade de développement et le poids corporel. Par exemple, les doses nécessaires pour anesthésier un têtard sont généralement plus petites que celles requises pour anesthésier un adulte [36, 48]. Par ailleurs, même une fois adultes, certains amphibiens peuvent prendre différentes formes qui réagissent différemment à l'anesthésie. Par exemple, certaines salamandres adultes ressemblant à leur forme larvaire (adultes pédomorphiques) sont plus sensibles aux effets de l'anesthésie que leurs congénères ayant subi une métamorphose plus extensive (adultes métamorphiques) [39].

Pour ce qui est du poids corporel, l'effet sur la réponse à l'anesthésie est variable selon les études. Par exemple, en anesthésiant des ouaouarons (*Rana catesbeiana*) et des grenouilles léopard (*Rana pipiens*) avec une injection intracoelomique de MS-222, Letcher n'a pas trouvé de corrélation entre le poids corporel et la durée et la profondeur de l'anesthésie [45]. Étonnamment cependant, un poids corporel plus élevé a été associé à un temps d'induction plus long dans certaines études [40, 91] et plus court dans d'autres [92].

Dans notre étude, un poids corporel plus petit était associé à une sensibilité accrue à l'anesthésique [16]. Cette différence pourrait s'expliquer en partie par une plus grande absorption du médicament par voie cutanée chez les plus petits individus. En effet, chez les anoures, la relation entre le poids corporel et la surface de l'animal peut s'exprimer par l'équation suivante :  $S = 1,131P^{0,58}$ , où P est le poids corporel en grammes et S est la surface en centimètres carrés [38]. Les petites grenouilles ont donc proportionnellement une plus grande surface disponible pour l'absorption du médicament par unité de poids

corporel. La différence de sensibilité pourrait aussi être due à une différence dans le métabolisme hépatique en fonction de l'âge des grenouilles.

### **Effets cardiorespiratoires**

En plus de son effet sur le temps d'induction, nous avons démontré que le poids corporel avait une incidence sur la réponse du système cardiovasculaire à l'anesthésie. En effet, l'eugénol diminuait la fréquence cardiaque de façon significative chez les petites et moyennes grenouilles, alors qu'il n'y avait pas d'effet sur les grosses grenouilles. Par ailleurs, il y avait une légère diminution de la saturation en oxygène chez les petites grenouilles, mais ce changement n'était pas statistiquement significatif. Ces résultats suggèrent un effet dépressur de l'eugénol sur le système cardiovasculaire, qui est plus prononcé avec un poids corporel plus petit [16].

Nous n'avons pas mesuré l'effet de l'eugénol sur la fréquence respiratoire. Cependant, dans une étude précédente, il a été démontré que l'eugénol la diminuait de façon significative [14]. Dans une autre étude, la fréquence cardiaque et la fréquence respiratoire étaient toutes deux diminuées suite à l'anesthésie au clou de girofle [13].

Chez les amphibiens, une diminution marquée de la fréquence respiratoire est fréquente lors de l'anesthésie et il peut même y avoir une période d'apnée prolongée [12-14, 38, 40]. Une diminution de la fréquence cardiaque est aussi parfois observée mais ne devrait pas dépasser 20% [48]. Les grenouilles *Xenopus laevis* sont des animaux aquatiques chez qui les échanges gazeux se font principalement par la peau et donc ceux-ci peuvent être suffisants pour assurer l'homéostasie de l'animal même en période d'apnée [38]. Compte tenu des effets cardiovasculaires observés dans notre étude, il serait peut-être préférable d'oxygéner la solution anesthésique pour maximiser l'absorption cutanée d'oxygène et s'assurer d'une bonne oxygénation des tissus [37, 48].

### **Effets digestifs**

Dans les 24 heures suivant l'anesthésie, nous n'avons pas observé d'effets secondaires notables. Un seul animal a vomi à la fin de l'anesthésie, mais tous les animaux mangeaient bien et avaient un comportement normal dans les heures suivantes [16].

Des effets secondaires sur le système digestif avaient aussi été décrits dans des études précédentes suite à l'anesthésie à l'eugénol ou à l'huile de clou de girofle. Lafortune *et al.* (2001) ont décrit des prolapsus gastriques chez la moitié des grenouilles anesthésiées à l'huile de clou de girofle, tandis que Guenette *et al.* (2007) ont décrit des vomissements suite à l'anesthésie à l'eugénol. Ces effets secondaires étaient bénins, puisque les prolapsus gastriques se résorbaient spontanément en moins d'une minute, et tous les animaux semblaient en pleine forme et avaient un appétit normal dans les 24 heures suite à la procédure [13, 14].

Les prolapsus gastriques sont communs chez les amphibiens et peuvent faire suite à l'ingestion d'une substance nocive mais peuvent aussi avoir une cause métabolique, toxique, infectieuse (e.g. parasitaire) ou faire suite à un mauvais état général de l'animal [36]. Les grenouilles peuvent ainsi éverser leur estomac et utiliser leurs pattes pour retirer une substance indigeste ou toxique [18]. La cause des prolapsus gastriques et des vomissements associés au clou de girofle et à l'eugénol est inconnue, cependant en l'absence d'autres signes cliniques associés, et puisqu'il n'y avait pas de lésions histologiques dans les sections d'estomac et d'intestins examinées [17], ces effets ne sont pas considérés comme indésirables. Cependant, il serait peut-être préférable de mettre les grenouilles à jeun avant l'anesthésie pour prévenir de potentielles complications comme des pneumonies par aspiration. De plus, dans notre étude, la réponse à l'anesthésie était mesurée à l'aide du test à l'acide acétique; nous ne pouvons pas éliminer la possibilité que l'application d'acide acétique sur la peau des animaux ait pu contribuer aux vomissements observés.

### **Comparaison de l'efficacité**

L'efficacité anesthésique de l'eugénol chez la grenouille *Xenopus laevis* est comparable aux résultats obtenus avec le MS-222, bien qu'il y ait des variations en fonction du poids des animaux, de la concentration de la solution anesthésique et du temps d'exposition. Par exemple, l'immersion de grosses grenouilles ( $103 \pm 16$ g) pendant 20 minutes dans une solution de MS-222 de 1 ou 2 g/L permet d'obtenir une anesthésie d'au plus 30 ou 60 minutes respectivement; en comparaison, les réflexes sont absents jusqu'à 60 minutes

chez la plupart des grosses grenouilles (90 à 140g) suite à une immersion de 15 minutes dans une solution d'eugénol de 350 mg/L. Cependant, l'anesthésie a été atteinte chez tous les sujets avec le MS-222, tandis qu'un animal n'a pas été anesthésié avec l'eugénol. Toujours chez les grosses grenouilles, autant le MS-222 que l'eugénol causent une diminution marquée de la fréquence respiratoire sans effet sur la fréquence cardiaque, cependant la fréquence respiratoire est revenue à des valeurs normales en 15 à 30 minutes avec le MS-222, comparativement à 2 heures pour l'eugénol [14, 63]. De plus, chez les petites et moyennes grenouilles, l'eugénol a un effet dépresseur sur la fréquence cardiaque dans les 30 premières minutes [16]. Par ailleurs, le temps de demi-vie du MS-222 est légèrement plus court que celui de l'eugénol, soit 3,2 heures pour le MS-222 contre 4 heures pour l'eugénol [14, 63]. Compte tenu de l'efficacité variable de l'eugénol chez les grosses grenouilles ainsi que des effets dépresseurs de l'eugénol sur la fréquence cardiaque chez les petites et moyennes grenouilles, l'utilisation du MS-222 pour l'anesthésie des grenouilles *Xenopus laevis* nous semble préférable à l'eugénol en fonction des paramètres physiologiques mesurés suite à l'anesthésie.

## **Toxicité de l'eugénol**

Dans le deuxième article, nous avons évalué la toxicité de l'eugénol chez des grenouilles *Xenopus laevis* ayant un poids moyen de 28,2 g, ce qui a permis d'identifier les organes cibles comme étant les reins, le foie et les poumons. De plus, des hémorragies dans les tissus adipeux suggèrent un effet sur les mécanismes de coagulation [17]. Ces résultats sont compatibles avec ce qui avait préalablement été observé dans les cas d'intoxications humaines ou dans les expérimentations animales avec de l'eugénol ou de l'huile de clou de girofle. Alors que les lésions rénales et pulmonaires étaient présentes chez des animaux ayant reçu une seule administration, les lésions hépatiques et les hémorragies se manifestaient seulement après trois administrations.

Un total de quatre animaux sont morts prématurément lors de cette étude [17]. Bien que nous ne puissions déterminer précisément la cause de leur mort, la nécrose hépatique, l'apoptose tubulaire rénale et/ou les membranes hyalines pulmonaires ont pu contribuer à

ces mortalités. La raison de la grande sensibilité des grenouilles *Xenopus* aux effets toxiques de l'eugénol reste indéterminée. Certaines études démontrent que les grenouilles ont une faible capacité à métaboliser les composés phénolés par glucuroconjugaison, ce qui pourrait ralentir leur élimination et exacerber leur toxicité [93]. Cependant, cette particularité du métabolisme des amphibiens ne se reflète pas dans les études de pharmacocinétique de l'eugénol chez la grenouille. En effet, le temps de demi-vie de l'eugénol chez le rat est plus long que chez la grenouille; chez le rat, il est de 14 heures dans le plasma et de 18,3 heures dans le sang lorsqu'administré par voie orale à une dose de 40 mg/kg, comparativement à 4 heures dans le sang d'une grenouille *Xenopus laevis* lorsqu'administré par immersion de 15 minutes dans une solution de 350 mg/L [14, 94]. Des temps de demi-vie beaucoup plus courts ont été mesurés chez le rat suite à une administration intraveineuse de 20 mg/kg (7,05 minutes dans le plasma et 12,6 minutes dans le sang), mais ces résultats ont été calculés sur une plus courte période de temps suite à l'administration [95].

L'apoptose tubulaire rénale que nous avons observée est compatible avec les anomalies urinaires présentes dans les cas d'intoxication à l'huile de clou de girofle chez des jeunes enfants [70-74]. La morphologie de l'apoptose tubulaire et le fait qu'un segment spécifique du néphron soit affecté (tubules distaux) suggèrent un effet toxique direct plutôt qu'un effet indirect (par exemple secondaire à l'ischémie) [96]. Les lésions rénales pourraient avoir été causées par l'eugénol inchangé et/ou un de ses métabolites, et la présence de tubules en régénérescence dans les reins des animaux après la période de récupération indique qu'elles sont réversibles.

Le potentiel pour l'eugénol et ses dérivés de causer de l'apoptose a été démontré sur plusieurs lignées cellulaires dont des cellules de mélanome, ostéosarcome, leucémie, et mastocytome. Cet effet a été démontré autant *in vitro* (à l'aide de cultures cellulaires) qu'*in vivo* (sur des xénogreffes). Les cellules affectées démontrent les changements typiques de l'apoptose comme la condensation et la fragmentation du noyau, et l'apoptose a été confirmée par des tests complémentaires comme le transfert de protéines (*western blot*) pour démontrer l'activation des caspases, la technique de TUNEL (*Terminal*

*deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) pour détecter la fragmentation de l'ADN et le PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pour démontrer l'augmentation de synthèse de molécules pro-apoptotiques comme p53 et Bax et la diminution de synthèse de molécules anti-apoptotiques comme c-Myc, H-ras et Bcl<sub>2</sub> [97]. Morphologiquement, les changements observés dans les reins des grenouilles que nous avons exposées à l'eugénol étaient compatibles avec de l'apoptose en raison de la présence de cellules arrondies avec un cytoplasme hyperéosinophile et un noyau pycnotique ainsi que l'absence d'inflammation [98]. Cependant, nous n'avons pas procédé aux tests permettant de confirmer l'apoptose car cela ne faisait pas partie des objectifs de l'étude, et nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que la lésion observée était en fait de la nécrose tubulaire aiguë.

Nous avons aussi observé de la nécrose hépatocellulaire suite à l'administration d'eugénol, ce qui est compatible avec les évidences d'insuffisance hépatique causées par l'huile de clou de girofle chez l'humain [70-74]. Le mécanisme de cette nécrose hépatique chez la grenouille pourrait être similaire à ce qui est observé chez les mammifères, soit une toxicité au moins en partie attribuable à un métabolite de l'eugénol dépendant du cytochrome P450 et associée à une perte de l'effet protecteur du glutathion dans les hépatocytes [75, 76, 78]. Dans notre étude, les poumons pourraient avoir été exposés à l'eugénol ou à un de ses métabolites de plus d'une façon. Lors de l'immersion, l'eugénol est absorbé systémiquement et distribué à tout l'organisme, incluant les poumons. Cependant, nous ne pouvons pas éliminer la possibilité qu'une petite quantité d'eugénol ait été inhalée durant l'immersion, exposant les poumons de façon directe. La toxicité pulmonaire de l'eugénol et de l'huile de clou de girofle a été rapportée chez l'humain et les animaux avec plusieurs voies d'administrations différentes, soit l'injection intraveineuse, l'inhalation et l'instillation intratrachéale [81, 82, 85, 86]. Le principal changement commun à toutes ces études est de l'oedème pulmonaire, avec ou sans hémorragies, suggérant une augmentation de la perméabilité vasculaire dans les poumons et/ou un dommage à l'épithélium alvéolaire. Dans notre étude, un dommage à l'épithélium des sacs alvéolaires est suggéré par la

présence de membranes hyalines contenant des débris cellulaires, ainsi que des sacs alvéolaires tapissés de cellules cylindriques.

Finalement, les hémorragies observées dans les corps adipeux sont vraisemblablement secondaires à la nécrose hépatique via une diminution de synthèse des facteurs de coagulation par le foie, tel que suggéré par Brown *et al.* (1992) dans le cas d'un enfant intoxiqué à l'huile de clou de girofle [70]. Nous ne pouvons cependant pas éliminer la possibilité d'un effet primaire de l'eugénol via une inhibition de la synthèse de thromboxane [79, 80].

L'apoptose tubulaire rénale, la nécrose hépatique et les membranes hyalines pulmonaires étaient relativement étendues et sévères chez les grenouilles ayant reçu trois administrations, ce qui est évidemment incompatible avec les propriétés attendues d'un anesthésique. Chez les animaux ayant reçu une seule administration cependant, les lésions hépatiques étaient absentes, les membranes hyalines pulmonaires étaient minimales chez un seul animal et les lésions tubulaires rénales étaient légères à modérées (moins de 25% des tubules affectés). Malgré tout, les lésions rénales observées sont susceptibles d'affecter le bien-être et la performance générale de la grenouille ou d'affecter sa capacité à s'adapter à son environnement. Pour cette raison, les lésions rénales sont considérées comme indésirables [99]. L'eugénol ne devrait donc pas être utilisé pour l'anesthésie des grenouilles moyennes par immersion pendant 10 minutes dans une solution de 350 $\mu$ L/L.

Ces résultats contrastent avec ceux obtenus chez les grosses grenouilles (90 à 140g) chez qui les organes cibles ne montraient pas de lésions après une immersion de 15 minutes dans une solution de 350 mg/L [14]. À la concentration et avec les temps d'immersion testés, l'eugénol est donc sécuritaire chez les grosses grenouilles mais produit des effets indésirables chez les moyennes grenouilles, ce qui suggère une marge sécuritaire faible. Par ailleurs, l'innocuité de l'eugénol n'a pas été déterminée lors d'administrations multiples chez les grosses grenouilles; la période de temps nécessaire entre deux anesthésies pour éviter qu'un effet cumulatif n'entraîne une toxicité reste donc à déterminer.

Ces résultats mettent aussi en évidence l'importance du poids corporel dans la susceptibilité aux effets toxiques de l'eugénol. Encore une fois, ceci pourrait en partie s'expliquer par la

plus grande surface d'absorption par unité de poids corporel chez les plus petits individus [38]. L'importance du poids corporel dans la susceptibilité aux anesthésiques chez les amphibiens est connue, cependant la relation peut être surprenante : en effet, dans une étude sur 4 espèces différentes d'amphibiens, les animaux avec le poids corporel le plus élevé avaient plus de chances de décéder suite à l'anesthésie à la benzocaïne ou au MS-222 ( $p < 0,05$ ) [40].

## Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que le temps d'exposition à une solution d'eugénol nécessaire pour atteindre un niveau d'anesthésie similaire chez des petites, moyennes et grosses grenouilles variait en fonction du poids corporel de l'animal. En effet, pour atteindre un niveau d'anesthésie similaire avec une solution d'eugénol de 350 $\mu$ L/L, le temps d'exposition était de 5, 10 et 15 minutes pour les petites, moyennes et grosses grenouilles respectivement. De plus, la réponse du système cardiovasculaire variait selon les groupes de poids, les petites grenouilles étant généralement plus affectées par l'anesthésie.

Par ailleurs, nous avons démontré que les principaux organes cibles lors de l'évaluation de la toxicité de l'eugénol chez la grenouille étaient les reins, le foie et les poumons. Chez des grenouilles d'un poids moyen de 28,2g, nous avons observé des lésions indésirables dans les reins et les poumons suite à une administration, en plus de lésions dans le foie et des hémorragies suite à trois administrations. L'immersion dans une solution d'eugénol de 350 $\mu$ L/L pendant 10 minutes n'est donc pas recommandée pour l'anesthésie des grenouilles de ce groupe de poids corporel. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec des animaux de poids corporel supérieur, chez qui le protocole anesthésique testé était sécuritaire [14]. D'autres études sont nécessaires pour trouver une concentration et un temps d'exposition à une solution d'eugénol qui seraient à la fois efficaces et sécuritaires chez des grenouilles *Xenopus laevis* de différents poids corporels.

## Sources documentaires

1. Chaieb, K., et al., *The chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): a short review*. *Phytother Res*, 2007. **21**(6): p. 501-506.
2. Curtis, E.K., *In pursuit of palliation: oil of cloves in the art of dentistry*. *Bull Hist Dent*, 1990. **38**(2): p. 9-14.
3. Swahn, J.O., *Clove*, in *The Lore of Spices: Their History, Nature and Uses around the World*. 1991, Crescent Books: Avenel. p. 132-9.
4. Agbaje, E.O., A.A. Adeneye, and A.O. Daramola, *Biochemical and toxicological studies of aqueous extract of Syzigium aromaticum (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) in rodents*. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2009. **6**(3): p. 241-254.
5. Soto, C.G. and Burhanuddin, *Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (Siganus lineatus)*. *Aquaculture*, 1995. **136**(1-2): p. 149-152.
6. Keene, J.L., et al., *The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*. *Aquac Res*, 1998. **29**(2): p. 89-101.
7. Walsh, C.T. and B.C. Pease, *The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, Anguilla reinhardtii (Steindachner)*. *Aquac Res*, 2002. **33**: p. 627-635.
8. Woody, C.A., J. Nelson, and K. Ramstad, *Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials*. *J Fish Biol*, 2002. **60**(2): p. 340-347.
9. Iversen, M., et al., *The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S(TM) and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity*. *Aquaculture*, 2003. **221**(1-4): p. 549-566.
10. Grush, J., D.L. Noakes, and R.D. Moccia, *The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, Danio rerio (Hamilton)*. *Zebrafish*, 2004. **1**(1): p. 46-53.
11. Soltani, M., G.H. Marmari, and M.R. Mehrabi, *Acute Toxicity and Anesthetic Effects of Clove Oil in Penaeus semisulcatus under Various Water Quality Conditions*. *Aquacult Int*, 2004. **12**(4): p. 457-466.

12. Waterstrat, P.R. and L. Plnkham, *Evaluation of Eugenol as an Anesthetic for the American Lobster Homerus americanus*. J World Aquacult Soc, 2005. **36**(3): p. 420-424.
13. Lafortune, M., M. Mitchell, and J. Smith, *Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of leopard frogs, Rana pipiens*. J Herpet Med Surg, 2001. **11**(4): p. 13-18.
14. Guenette, S.A., et al., *Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (Xenopus laevis)*. Vet Anaesth Analg, 2007. **34**(3): p. 164-170.
15. Mitchell, M.A., et al., *Evaluating the Clinical and Cardiopulmonary Effects of Clove Oil and Propofol in Tiger Salamanders (Ambystoma tigrinum)*. J Exot Pet Med, 2009. **18**(1): p. 50-56.
16. Goulet, F., P. Helie, and P. Vachon, *Eugenol anesthesia in African clawed frogs (Xenopus laevis) of different body weights*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010. **49**(4): p. 460-463.
17. Goulet, F., P. Vachon, and P. Helie, *Evaluation of the toxicity of eugenol at anesthetic doses in African clawed frogs (Xenopus laevis)*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(3): p. 471-477.
18. Green, S.L., *Important biological features*, in *The Laboratory Xenopus sp.*, S.L. Green, Editor. 2010, CRC Press: Boca Raton. p. 1-18.
19. Brown, D.D., *A tribute to the Xenopus laevis oocyte and egg*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45291-45299.
20. Crew, F.A.E., *Biological Tests for Diagnosis of Pregnancy*. BMJ, 1939. **1**(4084): p. 766-770.
21. Hobson, B.M., *Routine Pregnancy Diagnosis and Quantitative Estimation of Chorionic Gonadotrophin Using Female Xenopus Laevis*. BJOG- Int J Obstet Gy, 1952. **59**(3): p. 352-362.
22. Gurdon, J.B., *The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of Xenopus laevis*. J Embryol Exp Morphol, 1960. **8**: p. 505-526.
23. Gurdon, J.B., et al., *Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells*. Nature, 1971. **233**(5316): p. 177-182.
24. Preston, G.M., et al., *Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein*. Science, 1992. **256**(5055): p. 385-387.

25. Dawson, D.A., C.A. McCormick, and J.A. Bantle, *Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX)*. J Appl Toxicol, 1985. **5**(4): p. 234-244.
26. Edmisten, G.E. and J.A. Bantle, *Use of Xenopus laevis larvae in 96-hour, flow-through toxicity tests with naphthalene*. Bull Environ Contam Toxicol, 1982. **29**(4): p. 392-399.
27. Mouche, I., L. Malesic, and O. Gillardeaux, *FETAX assay for evaluation of developmental toxicity*. Methods Mol Biol, 2011. **691**: p. 257-269.
28. Richards, S.M. and S.E. Cole, *A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to Xenopus laevis larvae*. Ecotoxicology, 2006. **15**(8): p. 647-656.
29. Bosisio, S., et al., *Developmental toxicity, uptake and distribution of sodium chromate assayed by frog embryo teratogenesis assay-Xenopus(FETAX)*. Sci Total Environ, 2009. **407**(18): p. 5039-5045.
30. Carr, J.A., et al., *Response of larval Xenopus laevis to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology*. Environ Toxicol Chem, 2003. **22**(2): p. 396-405.
31. Monetti, C., et al., *Platinum toxicity and gene expression in Xenopus embryos: analysis by FETAX and differential display*. Altern Lab Anim, 2003. **31**(4): p. 401-408.
32. Brennan, L.M., et al., *Developmental toxicity of drinking water disinfection by-products to embryos of the African clawed frog (Xenopus laevis)*. Bull Environ Contam Toxicol, 2005. **75**(2): p. 361-367.
33. Bacchetta, R., et al., *Axial-skeletal defects caused by Carbaryl in Xenopus laevis embryos*. Sci Total Environ, 2008. **392**(1): p. 110-118.
34. Vrskova, D. and H. Modra, *Evaluation of the developmental toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil anaesthetics using the Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus (FETAX)*. Vet Med-Czech, 2012. **57**(5): p. 245-250.
35. Machin, K.L., *Amphibian pain and analgesia*. J Zoo Wildl Med, 1999. **30**(1): p. 2-10.
36. Hadfield, C.A. and B.R. Whitaker, *Amphibian Emergency Medicine and Care*. Semin Avian Exot Pet, 2005. **14**(2): p. 79-89.
37. Mitchell, M.A., *Anesthetic Considerations for Amphibians*. J Exot Pet Med, 2009. **18**(1): p. 40-49.

38. Hutchison, V.H., W.G. Whitford, and M. Kohl, *Relation of body size and surface area to gas exchange in anurans*. *Physiol Zool*, 1968. **41**: p. 65-85.
39. Crook, A.C. and H.H. Whiteman, *An Evaluation of MS-222 and Benzocaine as Anesthetics for Metamorphic and Paedomorphic Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum nebulosum*)*. *Am Midl Nat*, 2006. **155**(2): p. 417-421.
40. Cecala, K.K. and S.J. Price, *A Comparison of the Effectiveness of Recommended Doses of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and Orajel® (benzocaine) for Amphibian Anesthesia*. *Herpet Rev*, 2007. **38**(1): p. 63-66.
41. Guenette, S.A., F. Beaudry, and P. Vachon, *Anesthetic properties of propofol in African clawed frogs (*Xenopus laevis*)*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2008. **47**(5): p. 35-38.
42. Wass, J.A. and H.M. Kaplan, *Methoxyflurane anesthesia for *Rana pipiens**. *Lab Anim Sci*, 1974. **24**(4): p. 669-671.
43. Barter, L.S., et al., *Isoflurane potency in the northern leopard frog *Rana pipiens* is similar to that in mammalian species and is unaffected by decerebration*. *Vet Res Commun*, 2007. **31**(6): p. 757-763.
44. Smith, J.M. and K.C. Stump, *Isoflurane anesthesia in the African clawed frog (*Xenopus laevis*)*. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2000. **39**(6): p. 39-42.
45. Letcher, J., *Intracoelomic use of tricaine methanesulfonate for anesthesia of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) and leopard frogs (*Rana pipiens*)*. *Zoo Biol*, 1992. **11**(4): p. 243-251.
46. Letcher, J. and R. Durante, *Evaluation of use of tiletamine/zolazepam for anesthesia of bullfrogs and leopard frogs*. *J Am Vet Med Assoc*, 1995. **207**(1): p. 80-82.
47. Cakir, Y. and S.M. Strauch, *Tricaine (MS-222) is a safe anesthetic compound compared to benzocaine and pentobarbital to induce anesthesia in leopard frogs (*Rana pipiens*)*. *Pharmacol Rep*, 2005. **57**(4): p. 467-474.
48. Wright, K.M., *Restraint Techniques and Euthanasia*, in *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*, K.M. Wright and B.R. Whitaker, Editors. 2001, Krieger Publishing Company: Malabar. p. 111-122.
49. Stevens, C.W., *Alternatives to the use of mammals for pain research*. *Life Sci*, 1992. **50**(13): p. 901-912.

50. Jørgensen, C.B.C., *Amphibian respiration and olfaction and their relationships: from Robert Townson (1794) to the present*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2000. **75**(3): p. 297-345.
51. Wojick, K.B., J.N. Langan, and M.A. Mitchell, *Evaluation of MS-222 (Tricaine Methanesulfonate) and Propofol as Anesthetic Agents in Sonoran Desert Toads (Bufo alvarius)*. J Herpet Med Surg, 2010. **20**(2-3): p. 79-83.
52. Pinder, A.W. and W.W. Burggren, *Ventilation and partitioning of oxygen uptake in the frog Rana pipiens: effects of hypoxia and activity*. J Exp Biol, 1986. **126**: p. 453-468.
53. Downes, H., *Tricaine Anesthesia in Amphibia: A Review*. Bull Assoc Rept Amphib Vet, 1995. **5**: p. 11-16.
54. Stetter, M.D., et al., *Isoflurane anesthesia in amphibians: comparison of five application methods*. Proc Am Assoc Zoo Vet, 1996: p. 255-257.
55. Von Esse, F.V. and K.M. Wright, *Effect of intracoelomic Propofol in White's Tree frogs, Pelodryas Caerulea*. Bull Assoc Rept Amphib Vet, 1999. **9**(3): p. 7-8.
56. Tazawa, H., M. Mochizuki, and J. Piiper, *Respiratory gas transport by the incompletely separated double circulation in the bullfrog, Rana catesbeiana*. Respir Physiol, 1979. **36**(2): p. 77-95.
57. Delong, K.T., *Quantitative analysis of blood circulation through the frog heart*. Science, 1962. **138**(3541): p. 693-694.
58. Stahl, W.R., *Scaling of respiratory variables in mammals*. J Appl Physiol, 1967. **22**(3): p. 453-460.
59. Ross, A., et al., *Case of cutaneous necrosis in African clawed frogs Xenopus laevis after the topical application of eugenol*. Can Vet J, 2006. **47**(11): p. 1115-1117.
60. Gentz, E.J., *Medicine and surgery of amphibians*. ILAR J, 2007. **48**(3): p. 255-259.
61. Wayson, K.A., et al., *Studies on the comparative pharmacology and selective toxicity of tricaine methanesulfonate: metabolism as a basis of the selective toxicity in poikilotherms*. J Pharmacol Exp Ther, 1976. **198**(3): p. 695-708.
62. Wayson, K.A., et al., *Anesthetic effects and elimination of tricaine methanesulphonate (MS-222) in terrestrial vertebrates*. Comp Biochem Physiol C, 1976. **55**(1): p. 37-41.

63. Lalonde-Robert, V., F. Beaudry, and P. Vachon, *Pharmacologic parameters of MS222 and physiologic changes in frogs (Xenopus laevis) after immersion at anesthetic doses*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2012. **51**(4): p. 464-468.
64. Bernstein, P.S., K.B. Digre, and D.J. Creel, *Retinal toxicity associated with occupational exposure to the fish anesthetic MS-222*. Am J Ophthalmol, 1997. **124**(6): p. 843-844.
65. Fedewa, L.A. and A. Lindell, *Inhibition of Growth for Select Gram-Negative Bacteria by Tricaine Methane Sulfonate (MS-222)* J Herpet Med Surg 2005. **15**: p. 13-17.
66. Chen, M.H. and C.A. Combs, *An alternative anesthesia for amphibians: ventral application of Benzocaine*. Herpet Rev 1999. **30**(1): p. 34.
67. Kaiser, H. and D.M. Green, *Keeping the frogs still: Orajel [registered trademark] is a safe anesthetic in amphibian photography*. Herpet Rev, 2001. **32**(2): p. 93-94.
68. Brenner, G.M., et al., *Analgesic potency of alpha adrenergic agents after systemic administration in amphibians*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(2): p. 540-545.
69. Martin, B.J., *Evaluation of Hypothermia for Anesthesia in Reptiles and Amphibians*. ILAR J, 1995. **37**(4): p. 186-190.
70. Brown, S.A., J. Biggerstaff, and G.F. Savidge, *Disseminated intravascular coagulation and hepatocellular necrosis due to clove oil*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1992. **3**(5): p. 665-668.
71. Eisen, J.S., et al., *N-acetylcysteine for the treatment of clove oil-induced fulminant hepatic failure*. J Toxicol Clin Toxicol, 2004. **42**(1): p. 89-92.
72. Hartnoll, G., D. Moore, and D. Douek, *Near fatal ingestion of oil of cloves*. Arch Dis Child, 1993. **69**(3): p. 392-393.
73. Janes, S.E., C.S. Price, and D. Thomas, *Essential oil poisoning: N-acetylcysteine for eugenol-induced hepatic failure and analysis of a national database*. Eur J Pediatr, 2005. **164**(8): p. 520-522.
74. Lane, B.W., et al., *Clove oil ingestion in an infant*. Hum Exp Toxicol, 1991. **10**(4): p. 291-294.
75. Thompson, D.C., D. Constantin-Teodosiu, and P. Moldeus, *Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes*. Chem Biol Interact, 1991. **77**(2): p. 137-147.

76. Thompson, D.C., R. Barhoumi, and R.C. Burghardt, *Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays*. Toxicol Appl Pharmacol, 1998. **149**(1): p. 55-63.
77. Mizutani, T., et al., *Hepatotoxicity of eugenol in mice depleted of glutathione by treatment with DL-buthionine sulfoximine*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1991. **71**(2): p. 219-230.
78. Fischer, I.U., G.E. von Unruh, and H.J. Dengler, *The metabolism of eugenol in man*. Xenobiotica, 1990. **20**(2): p. 209-222.
79. Chen, S.J., M.H. Wang, and I.J. Chen, *Antiplatelet and calcium inhibitory properties of eugenol and sodium eugenol acetate*. Gen Pharmacol, 1996. **27**(4): p. 629-633.
80. Raghavendra, R.H. and K.A. Naidu, *Spice active principles as the inhibitors of human platelet aggregation and thromboxane biosynthesis*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. **81**(1): p. 73-78.
81. Kirsch, C.M., et al., *Non-cardiogenic pulmonary oedema due to the intravenous administration of clove oil*. Thorax, 1990. **45**(3): p. 235-236.
82. Wright, S.E., D.A. Baron, and J.E. Heffner, *Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms*. J Lab Clin Med, 1995. **125**(2): p. 257-264.
83. Right, D.A. and J.P. Payne, *A Clinical Study of Intravenous Anaesthesia with a Eugenol Derivative, G.29.505*. Brit J Anaesth, 1962. **34**(6): p. 379-385.
84. Isaacs, G., *Permanent local anaesthesia and anhidrosis after clove oil spillage*. Lancet, 1983. **1**(8329): p. 882.
85. CDC, *Epidemiologic Notes and Reports Illnesses Possibly Associated with Smoking Clove Cigarettes*. MMRW Weekly, 1985. **34**(21): p. 297-299.
86. LaVoie, E.J., et al., *Toxicity studies on clove cigarette smoke and constituents of clove: determination of the LD50 of eugenol by intratracheal instillation in rats and hamsters*. Arch Toxicol, 1986. **59**(2): p. 78-81.
87. Bhalla, M. and G.P. Thami, *Acute urticaria due to dental eugenol*. Allergy, 2003. **58**(2): p. 158.
88. Grade, A.C. and B.P. Martens, *Chronic urticaria due to dental eugenol*. Dermatologica, 1989. **178**(4): p. 217-220.

89. Mastalerz, L., M. Setkowicz, and A. Szczeklik, *Mechanism of chronic urticaria exacerbation by aspirin*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005. **5**(4): p. 277-283.
90. Sanchez-Perez, J. and A. Garcia-Diez, *Occupational allergic contact dermatitis from eugenol, oil of cinnamon and oil of cloves in a physiotherapist*. *Contact Dermatitis*, 1999. **41**(6): p. 346-347.
91. Peterman, W.E. and R.D. Semlitsch, *Effects of Tricaine Methanesulfonate (MS-222) Concentration on Anesthetization and Recovery in Four Plethodontid Salamanders*. *Herpet Rev*, 2006. **37**(3): p. 303-304.
92. Lowe, J., *Rates of tricaine methanesulfonate (MS-222) anesthetization in relation to pH and concentration in five terrestrial salamanders*. *Herpet Rev*, 2004. **35**(4): p. 352-354.
93. Gorge, G., J. Beyer, and K. Urich, *Excretion and metabolism of phenol, 4-nitrophenol and 2-methylphenol by the frogs Rana temporaria and Xenopus laevis*. *Xenobiotica*, 1987. **17**(11): p. 1293-1298.
94. Guenette, S.A., et al., *Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2007. **562**(1-2): p. 60-67.
95. Guenette, S.A., et al., *Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats*. *J Vet Pharmacol Ther*, 2006. **29**(4): p. 265-270.
96. Maxie, M.G. and S.J. Newman, *Acute tubular necrosis*, in *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Fifth edition*, Elsevier, Editor. 2007: Philadelphia. p. 466-468.
97. Jaganathan, S.K. and E. Supriyanto, *Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells*. *Molecules*, 2012. **17**(6): p. 6290-6304.
98. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C., *Cellular Responses to Stress and Toxic Insults: Adaptation, Injury, and Death.*, in *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Eighth edition* A.K.A. V. Kumar, N. Fausto, J.C. Aster, eds., Editor. 2010, Saunders Elsevier: Philadelphia. p. 25-27.
99. Lewis, R.W., et al., *Recognition of Adverse and Nonadverse Effects in Toxicity Studies*. *Toxicol Pathol*, 2002. **30**(1): p. 66-74.

