

**EVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITE DE L'HUILE
ESSENTIELLE DE *MELALEUCA QUINQUENERVIA* (Cav) S.T.
BLACK (NIAOULI) CHEZ LE RAT WISTAR**

Anatole LALEYE¹, Joachim GBENOU², Patrick EDORH³ Flore GANGBO¹,
Dyana ANTHONY¹, Romain DAHO¹, Eléonore YAYI², Léon AHOUSSE², Fernand
GBAGUIDI², Raphaël DARBOUX¹ et Mansour MOUDACHIROU²

1 *Unité de Biologie Humaine, Faculté des Sciences de la Santé, U. A. C.,
01BP 188 Cotonou. - Tél. 00 229 38 41 90, e-mail cvtogen@inmet.bj, Bénin*

2 *Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles, Faculté des Sciences
de la Santé, Faculté des Sciences et Techniques, U. A. C., 01BP 188 Cotonou,
e-mail : pharmaco@inmet.bj, Bénin*

3 *Laboratoire de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences et
Techniques, UAC, - 01BP 526. Tél et Fax, 00229 32 24 11, patrickedorh@yahoo.fr
(Reçu le 3/10/03 - accepte le 06/06/2004)*

*Summary: Administrated by intra-peritoneal way at 1350mg/kg/day during 18 days, essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (chemotype 1,8-cineole 50.5%) has shown toxicity in pregnant Wistar rat, it's embryo and foetuses. This treatment induced pregnancy rate decrease by 10, 12 %, maternal death rate increase by 11, 11 %, liver and kidney's mean weight increase respectively by 0, 56 g and 0, 62 g ; uterine horns' atrophy and hepatic steatosis. It was also be noticed early in utero death rate's increase and embryo resorption ; finally, a fall in the farrow, a small birth weight and liver tissue destruction with inflammatory cells.*

Although the doses used in aromatherapy (5,7mg/kg/jour) are widely below that of our works, caution is recommended in the pregnant women.

*Key-words: embryotoxicity, foetotoxicity, essential oil, *Melaleuca quinquenervia**

* Auteur de correspondance

I - INTRODUCTION

L'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia*, encore appelée huile de Niaouli, est l'une des essences les plus utilisées pour ses propriétés thérapeutiques en particulier antitussives, antiseptiques, énergisantes et stimulantes pour les tissus^[1].

Pages et collaborateurs ont montré que certaines huiles essentielles présentent une embryotoxicité voire une tératogénicité^[2,3]. Par contre, celle d'*Eucalyptus globulus* de la même famille des Myrtaceae que *Melaleuca quinquenervia*, ne provoque quant à elle, ni embryotoxicité, ni fœtotoxicité^[4]. Mais aucune étude n'a recherché, pour l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia*, ni sa dose toxique et ni sa tératogénicité sur l'animal de laboratoire. Le présent travail a pour but de rechercher d'éventuels effets toxiques de cette huile essentielle sur des embryons de rats de souche Wistar.

II - MATERIEL ET METHODE

II.1 - Matériel

Le matériel animal est fait de rates de souche Wistar, pesant en moyenne 177g, acclimatées aux conditions d'élevage de l'animalerie et ayant libre accès à l'eau et à la nourriture.

Le matériel végétal comprend l'huile vierge de maïs et l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Melaleuca quinquenervia* récoltées sur le site de Sémé-Podji (Axe Cotonou Porto-Novo) au cours de la période allant de Janvier à Mars 2002.

II.2 - Méthode

II.2.1- Extraction et analyse chromatographique de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle dure 3 heures, après 72 heures de séchage des végétaux à l'ombre. Elle est faite selon la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau saturée. L'analyse chromatographique est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de Marque Trace GC Thermo Quest, CE Instruments. Les conditions d'analyse sont les mêmes que celles décrites par M. MOUDACHIROU et collaborateurs^[5]. Les composants sont identifiés sur la base de leurs temps de rétention et leurs indices de Kovats. Les indices expérimentaux sont comparés à ceux de la littérature^[6-9].

II.2.2 - Recherche de toxicité aiguë et chronique de l'huile essentielle

Trente six (36) rates non gravides réparties en six (6) lots de 6 animaux ont reçu en injection intra-péritonéale (IP) une dose unique d'huile essentielle allant de 100mg/kg à 2400mg/kg de poids corporel sous un volume constant de 2,5 ml/kg.

De même, 36 autres rates non gravides ont reçu en IP et pendant 18 jours une dose journalière d'huile essentielle allant de 200mg/kg à 1350mg/kg de poids corporel sous un volume constant de 2,5 ml/kg.

II.2.3 - Recherche de l'embryotoxicité de l'huile essentielle de Melaleuca quinquenervia

Soixante douze (72) rates réparties en un groupe témoin et un groupe traité sont suivies sur une période de 18 jours allant du 5^e jour avant l'accouplement au 13^e après celui-ci.

Les rates du groupe traité ont reçu en IP l'huile essentielle à la dose de 1350 mg/kg de poids corporel sous un volume de 2,5 ml/kg ;

celles du groupe témoin, de l'huile de maïs à la dose de 2,5 ml/kg de poids corporel.

Au 6^e jour, toutes les rates sont accouplées. A la fin de la gestation, elles sont sacrifiées. Les organes prélevés lors de la dissection sont immédiatement fixés au formol tamponné à 10%. Les coupes de 5µm sont réalisées et colorées à l'hématéine éosine safran et observées sur un microscope photonique de marque Olympus BX-41 muni d'une caméra (JVC, 1/2 pouce). Les observations sont faites aux objectifs x 4 et x 40 ; les images sont enregistrées au format JPEG sur un ordinateur.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1 - Résultats

III.1.1 - Extraction et analyse de l'huile essentielle de Melaleuca quinquenervia

Le rendement en huile essentielle est de 1,14%. Les résultats de l'analyse chromatographique sont consignés dans le tableau 1. Les composants majoritaires sont : 1,8-cinéole (50,65%), α -terpinéol (10,54%), viridiflorol (9,47%), limonène (5,78%) et α -pinène (4,09%). De cette huile essentielle, 94,97 % des composés ont été identifiés dont 77,34% sont oxygénés et 17,63% sont non oxygénés.

TABLEAU 1 : Résultats de l'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia*

RESULTATS D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE			
N°	Indice de Kovats	Composés chimiques	Pourcentage (%)
1	933,3	α -thujène	1,17
2	936,5	α -pinène	4,087
3	964,9	camphène	0,559
4	978,6	sabinène	1,213
5	980,6	β - pinène	1,936
6	997,6	myrcène	0,32
7	1019,9	α -terpinène	0,278
8	1027,9	p-cymène	0,735
9	1032,2	limonène	5,775
10	1044,6	1.8-cinéole*	50,645
11	1061,9	α -terpinène	0,583
12	1092,3	terpinolène	0,22
13	1109,4	Linalol*	0,301
14	1160,5	Citronnellal*	0,339
15	1180,6	Borneol*	0,349
16	1189,9	Terpinen-4-ol*	1,022
17	1204,7	α -terpinéol*	10,544
18	1240,8	Citronnelol*	0,148
19	1361,4	Acétate d' α -terpenyle*	0,388
20	1430,2	β - caryophyllène	0,455
21	1505,6	viridiflorène	0,293
22	1574,1	Spathuléol*	3,054
23	1603,5	Oxyde de caryophyllène*	0,531
24	1611,1	Viridiflorol*	9,473
25	1656,6	T-cadinol*	0,226
26	1671,8	α -cadinol*	0,324
POURCENTAGES DES COMPOSES			
IDENTIFIES 94,97%		NON IDENTIFIES 5,03%	
* composés oxygénés 77,34%			
composés non oxygénés 17,63%			

III.1.2 – Etude de la toxicité aiguë et chronique de l'huile essentielle

Aucun animal n'a succombé ni à l'administration aiguë ni à l'administration chronique des différentes doses d'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia*.

III.1.3 – Etude de l'embryotoxicité

Les résultats sont consignés dans le tableau 2

TABLEAU 2 : Résultats de l'étude de la toxicité de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* chez la rate Wistar gravide

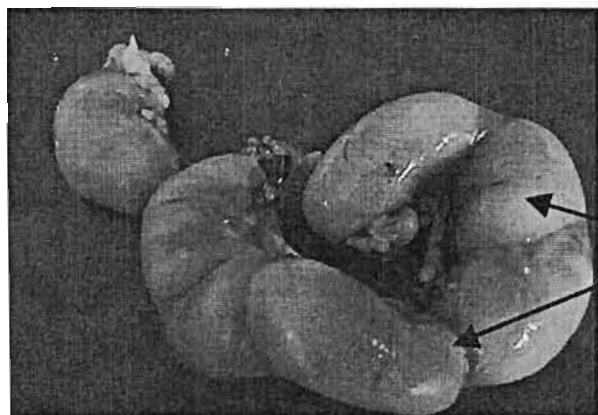
PARAMETRES ETUDIES	RATES TRAITEES (n = 36)	RATES TEMOINS (n = 36)
Gain pondéral moyen chez les rates	2,16 g ± 12,84	43,06g ± 11,76
Poids moyen du foie chez les rates	7,33 ± 2,27	6,77 ± 0,76
Poids moyen des reins	1,31 ± 0,17	0,69 ± 0,08
Taux de gravidité	28/36 78,78%	32/36 88,90%
Taux de mortalité maternelle	4/36 11,11%	00 0%
Fœtus vivant à terme (moyenne/ femelle)	0,27 ± 0,67	6,04 ± 1,78
Morts in utero précoce et résorption	5,85 ± 2,27	0,19 ± 0,69
Morts in utero tardives	0,69 ± 1,54	0,15 ± 0,78
Poids moyen des fœtus vivants à terme (g)	3,14 ± 0,60	4,02 ± 0,38
Poids moyen des placentas (g)	0,4 ± 0,39	0,62 ± 0,07

III.1.4 - Observations macroscopiques

a) Groupe des rates gestantes témoins

Dans la majorité des cas, la gestation s'est normalement déroulée, les fœtus sont de taille et de coloration normales (Figure 1).

FIGURE 1 : *Aspects de l'utérus de rate Wistar au cours d'une gestation normale*



Fœtus visibles
dans la corne
utérine

b) Groupe des rates gestantes traitées

L'observation macroscopique a révélé dans la plupart des cas, une ou plusieurs anomalies (figures 2, 3 et 4) :

- absence de fœtus dans l'une des cornes utérines
- atrophie d'une des deux cornes utérines,
- hypotrophie de certains fœtus dans la même portée,
- mort fœtale in utero.

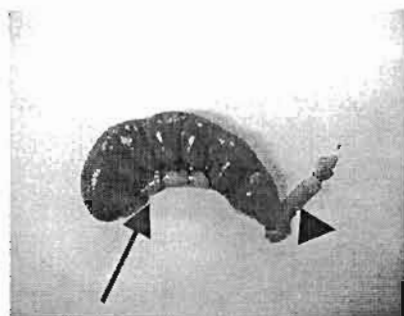


FIGURE 2: *Utérus gravide de rate Wistar traitée : la corne utérine gauche contient des fœtus de petite taille et la droite est atrophique*

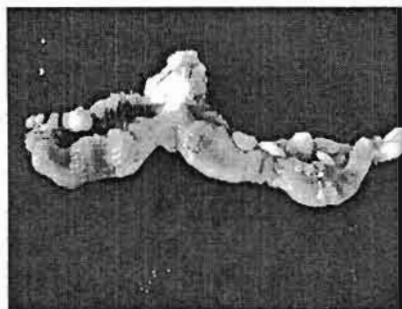


FIGURE 3: *Utérus gravide de rate Wistar traitée présentant 4 fœtus dont l'évolution est arrêtée*



FIGURE 4 : *Utérus de rate Wistar traitée : la corne utérine gauche contient un fœtus mort in utero tardif et la droite des points de résorption (tête de flèche)*

III.1.5 - Observations histologiques

a) Groupe des rates gestantes témoins

** Chez les rates*

➤ Le foie est normal avec des travées cellulaires disposées de façon concentrique autour d'une veine centro-lobulaire.

➤ L'architecture rénale est conservée.

** Chez les fœtus*

Tous les organes sont en place et facilement identifiables. Leur histologie est normale, en particulier les organes comme le rein et le foie.

b) Groupe des rates gestantes traitées

** chez les rates*

La structure hépatique est modifiée par une hypervascularisation et la présence de plusieurs cellules géantes plurinucléées à cytoplasme acidophile (figure 5). Celle du rein par contre est globalement conservée. Il existe toutefois de nombreuses vésicules claires au pôle basal de certaines cellules épithéliales glomérulaires et un élargissement de la lumière des tubes collecteurs (figure 6).

La paroi utérine est aussi globalement conservée; il existe cependant une altération vasculaire artérielle avec rupture de l'endothélium et accumulation de fibrine dans la paroi artérielle (figure 7).

FIGURE 5 : *Foie de rate Wistar gravide traitée montrant l'hypervascularisation et des cellules géantes plurinucléées (X 400)*

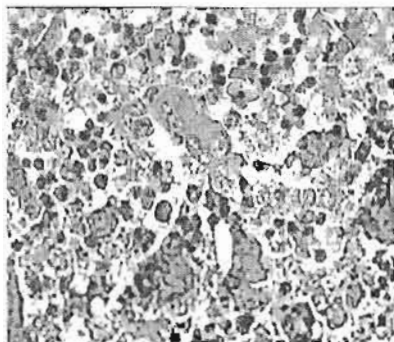


FIGURE 6 : *Parenchyme rénal de rate traitée gestante montrant des tubes collecteurs dilatés (X 400).*

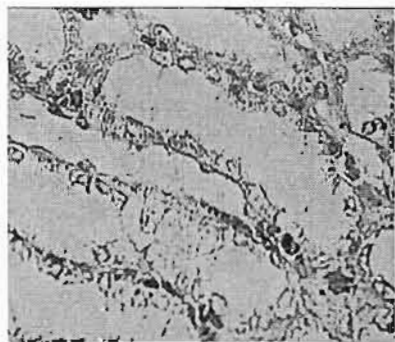
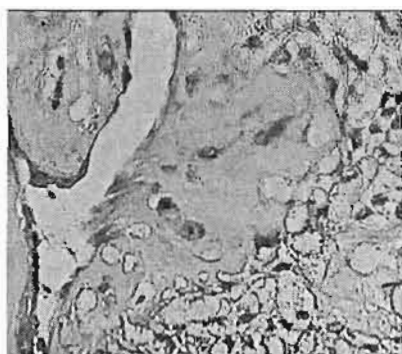


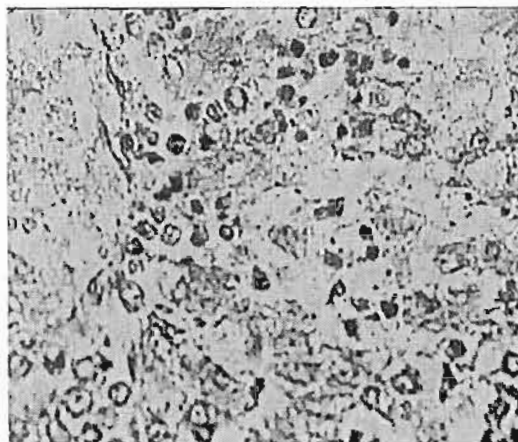
FIGURE 7 : *Paroi artérielle lésée avec la présence de fibrine dans la paroi (tête de flèche) (X 400)*



** Au niveau des fœtus*

Il est observé une destruction du parenchyme hépatique ; les travées hépatiques ne sont pas reconnaissables (figure 8).

FIGURE 8 : Foie de fœtus de rate Wistar traitée montrant la destruction de travées hépatiques et des cellules nécrosées (X 400)



IV - DISCUSSIONS

Les résultats de la chromatographie de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* sont globalement proches de ceux des travaux de M. MOUDACHIROU et collaborateurs^[10] et de SOUZA^[11]. Les composants majoritaires retrouvés sont les mêmes, leur proportion est parfois différente. Ceci s'explique bien si l'on sait qu'au sein de cette espèce végétale, il est décrit différents chémotypes et une grande variabilité dans les proportions suivant la saison ou le lieu de récolte et la durée de séchage^[10,12,13].

Nos travaux n'ont montré, en dehors de toute gravidité, aucune toxicité ni aiguë ni chronique de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* chez les rates Wistar.

Il est paradoxal de constater que cette huile présente de nombreux effets toxiques aussi bien pour la rate gravide que pour ses fœtus.

En effet, chez la rate gravide par rapport aux témoins, l'huile essentielle semble montrer de façon significative divers effets toxiques sur les paramètres étudiés notamment :

- une baisse sensible de la gravidité (78,78% contre 90%)
- une augmentation de la mortalité de 11,11 %
- un faible gain pondéral moyen (2,63 g contre 42,84g) ;
- une augmentation du poids moyen du foie (7,63 g contre 0,69 g)
- une augmentation du poids moyen des reins (1,3 g contre 0,7g)

De même, chez les fœtus de rates traitées, d'importants signes de toxicité ont été observés:

- un petit nombre de fœtus vivants soit une moyenne de 0,27 contre 6,04;
- un poids moyen de fœtus à terme de 3,14g contre 4,02g;
- une moyenne de mort fœtale in utero ou de résorption fœtale de 5,85 contre 0,19;
- un poids moyen de placenta plus faible : 0,4 g contre 0,62 g.

Chez les rates témoins, l'observation macroscopique ne montre aucune anomalie. Par contre, chez les rates traitées il est noté des modifications au niveau du foie et des reins.

Les lésions histologiques observées et nos différents résultats permettent de suspecter non seulement une embryotoxicité de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* mais aussi une certaine toxicité chez les rates gravides.

Habituellement chez l'homme, cette huile essentielle est utilisée à la posologie de 3 gouttes 3 fois par jour ce qui correspond à 342 mg

pour l'adulte de 60 kg. Cette dose est très largement en deçà de celle de nos expériences. Ceci fait penser qu'en usage courant, cette huile ne serait pas toxique. Cependant, FRANCHOMME et collaborateurs en 1990^[14], bien que ne reconnaissant aucune contre indication à l'utilisation de cette huile, recommandaient déjà la prudence quant à son usage chez la femme enceinte et chez le tout jeune enfant.

L'embryotoxicité observée au cours de nos expériences peut s'expliquer d'une part, par le fait que cette huile passerait la barrière placentaire et agirait sur les organes encore immatures du fœtus ; d'autre part, cette huile contient une forte proportion de composés oxygénés (77,34%) dont le métabolisme pourrait conduire à des substances très réactives riches en radicaux libres à fort potentiel toxique voire parfois carcinogène.

La toxicité de l'huile observée chez la rate gravide qui contraste avec son apparente innocuité en dehors de toute gravidité peut être mise sur le compte des modifications biologiques surtout hormonales en rapport avec cet état. Ces modifications pourraient influencer le métabolisme de cette huile et la rendre toxique.

V - CONCLUSION

L'injection intra péritonéale de l'huile essentielle *Melaleuca quinquenervia* à des rates Wistar donne des effets variables selon que l'animal est gravide ou non. Chez les rates non gravidées, il n'y a pas d'accidents toxiques notables aux doses employées. Par contre chez les rates gravidées et chez leurs embryons et fœtus, il est noté des signes de toxicité évidente avec présence de variables lésions microscopiques et macroscopiques au niveau de certains organes comme le foie et les reins. Les lésions ainsi observées peuvent être dues à la grande richesse de cette huile en composés oxygénés dont le

métabolisme conduirait à la production de substances très réactives riches en radicaux libres.

Les doses utilisées en pratique humaine sont suffisamment faibles pour craindre une toxicité comme celle observée au cours de nos expériences. Cependant, il faudrait faire attention à son emploi prolongé où il peut survenir des effets d'accumulation surtout chez la femme enceinte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1]- SOUTHWELL I A., Australian tea oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type. *Chemistry in Australia*. (1988) ; 55 : 400 – 402.

[2]- PAGES N., SALAZAR M., CHAMARRO G., FOURNIER G., DIMITRESCO S.M., BOUDENNE C. Teratological evaluation of *Plectranthus fruticosus* leaf essential oil. *Planta Med.*, (1988), 54, 296-298

[3]- PAGES N., FOURNIER G., CHAMARRO G., SALAZAR M., PARIS M., BOUDENNE C. Teratological evaluation of *Juniperus sabina* essential oil in mice. *Planta Med.* (1989), 55 (2) : 144-146

[4]- PAGES N., FOURNIER G., LELUYER F., MARQUES M. C., Les huiles essentielles et leurs propriétés tératogènes potentielles : exemple de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. Etude préliminaire chez la souris. *Plantes médicinales et Phytothérapie*. 1990 ; tome XXIV, n°1 pages : 21-26.

[5] - MOUDACHIROU M., GBÉNOU J. D., CHALCHAT J. C., CHABARD J. L. AND LATIGUE C., Chemical composition of *Eucalyptus* from Benin : *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus camadulensis*. Influence of Location, Harvest Time, Storage of Plants and Time of Steam Distillation, *J. Essent. Oil Res.*, (1999), 11, 109-118.

[6] - JENNINGS W., SHIBAMOTO T., Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. (1989); Academic Press, New York, 125p.

[7] - ADAMS R. P., Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. 1989 ; Academic Press, New York, 215p.

[8] - CHALCHAT J. C , GARRY R. P. et MICHET A. Liste des substances chimiquement définies identifiées dans les huiles essentielles et extraites. Document A : fichier résultats et Document B . 1995 ; SNIAN, 2^e Edition, Paris.

[9] - MASADA Y. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. 1992 ; Hirokawa Publishing Companing Inc. Tokyo, Japan.

[10] - MOUDACHIROU M., GBENOU J. D., GARNEAU F.-X., JEAN F-I., GAGNON H., KOUMAGLO K. H., ADDAE-MENSAH I. Leaf Oil of *Melaleuca quinquenervia*, *J. Essent. Oil Res.*, (1996), 67- 69.

[11] - DE SOUZA S., AYEDOUN M. A., BATONON A., AYISSE J., AKPLOGAN A. B., Essai d'aromathérapie par l'huile essentielle de Niaouli du Bénin. *Revue Méd. Pharm. Afr.* (1994) ; Vol 8 ; N°1: 55-58.

[12] - RAMANOELINA P. A. R., VIANO J., BIANCHINI J. P. AND GAYDOU E. M., Occurrence of Various Chemotypes in Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) Essential Oils from Madagascar Using Multivariate Statistical analysis, *J. of Agr. And Food Chem.*, (1994), 42, 1177-1182.

[13] - RAMANOELINA P. A. R., BIANCHINI J. P., ANDRIANTSIFERANA M., VIANO J., AND GAYDOU E. M., Chemical Composition of Niaouli Essential Oils from Madagascar, *J. Essent. Oil Res.*, (1992), 4, 657-658.

[14] - FRANCHOMME P, JOLLOIS R, PENOEL D ET MARS J. L'Aromathérapie exactement (Livre quatrième), 1990 ; Editions Jollois, Limoges, 535p.