



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج  
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية.

Département des Sciences biologiques

# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Toxicologie

## Intitulé

**Vue d'ensemble sur les techniques *in vitro*  
en Toxicologie : focus sur la technique HET-CAM.**

Présenté par : Bouzidi Moufid

Sahli Lokman Abderrahim

Soutenu le : .....

Devant le jury :

Président :	Mme. BELALMI Nour Elhouda.	MCB. Univ BBA
Encadrant :	M. MEZDOUR Hichem.	MCB. Univ BBA
Examineur :	Mme. BENRADIA Hamida	MCB. Univ BBA

Année universitaire : 2019/2020

## *Remerciements*

Après avoir rendu grâce à Allah le tout puissant et le miséricordieux,  
nous tenons à remercier :

Notre encadreur Dr. Mezdour Hichem pour son aide, sa confiance, sa  
disponibilité et ses conseils tout au long de cette période

Les jurés qui nous font honneur d'examiner ce travail

Les professeurs qui ont contribué à notre formation tout au long de  
notre cursus universitaire

Nos familles qui ont été un énorme soutien durant toutes nos études

Merci aux chercheurs dont les travaux nous a orientées et aidées à  
réaliser ce travaille.

## *Dédicace*

Je dédie ce Travail tous d'abord à ma mère et mon père

Aussi à mon frère et mes deux sœurs

Que dieu vous protèges tous

Sans oublier mon binôme Lokman.

Moufid.

## *Dédicace*

Je dédie ce travail à mes parents qui n'ont jamais hésité à m'offrir leurs aides et qui n'ont jamais cessé de m'encourager que la bénédiction du seigneur soit sur eux.

A ma sœur et a mon frère pour ses encouragements chaque jour de mon parcours.

A la personne a qui je dois ma vie, ma persévérance, ma motivation, mon courage et ma force. A la personne qui a toujours été a mes cotés pendant ce voyage vers le savoir et la science a ma très chère Ikram.

A mon binôme et ami Moufid qui a fait preuve de grande compétence et d'un grand esprit du travail au nom de la science et de la recherche.

A toute l'équipe de la faculté des sciences de la vie et de l'univers et à tous les enseignants sans exception.

Je vous dédie ce travail en espérant avoir été à la hauteur de vos attentes.

Lokmane Abderrahim.

## Liste des abréviations

**CEGA** : chicken egg génotoxicity assay.

**CHU** : Centre hospitalier universitaire.

**ECVAM** : centre européen pour la validation de méthodes alternatives.

**GPT** : guanine phosphoribosyl transférase.

**HET-CAM test** : test hen's egg-chorioallantoic membrane test.

**ICCVAM** : Le comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives.

**IgE** : immunoglobuline.

**IL**: Inter Loukine.

**IOCA** : in ovo cancerogenicity assays.

**JaCVAM** : centre japonais pour la validation de méthodes alternatives.

**MCA** : membrane chorio-allantoïdienne

**MCP** : Le chemokine ligand (en anglais Monocyte chemoattractant protein).

**MMP**: Métallo-protéase matricielle.

**ONU** : Organisation des Nations Unies.

**SGH** : Système général harmonisé.

**TEGA** : turkey eggs genotoxicite assay.

**TNF**: Les facteurs de nécrose tumorale (en anglais tumor necrosis factors).

**UDS** : unscheduled DNA synthesis.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Constitution d'un œuf .....	6
<b>Figure 2:</b> Anatomie de l' œil .....	7
<b>Figure 3:</b> Structure chimique et effet .....	8
<b>Figure 4:</b> L'addition .....	10
<b>Figure 5:</b> La synergie .....	11
<b>Figure 6:</b> La potentialisation.....	11
<b>Figure 7:</b> L'antagonisme .....	12
<b>Figure 8 :</b> Indication de la chambre à air .....	25
<b>Figure 9:</b> Préparation de la CAM.....	25
<b>Figure 10:</b> Répartition des produits cosmétiques testés par le HET-CAM selon le phénomène de coagulation.....	31
<b>Figure 11:</b> Répartition des produits cosmétiques testés par le HET-CAM selon le phénomène d'hémorragie.....	31
<b>Figure 12:</b> Répartition des produits testés selon le degré d'irritation.....	32

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Les formes d'intoxication .....	3
<b>Tableau II:</b> Les phénomènes observés pendant les essais de HET-CAM.....	27
<b>Tableau III:</b> Les phénomènes observé et leurs scores selon le temps d'apparition.....	28
<b>Tableau IV:</b> Expression des résultats selon la notation.....	28
<b>Tableau V:</b> Résultats des tests HET-CAM.....	29
<b>Tableau VI:</b> Classification des produits testés selon le potentiel d'irritation .....	32
<b>Tableau VII:</b> Comparaison entre les produits.....	33

# Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1
I. Généralité .....	2
I.1. Toxicologie .....	2
I.2. Toxicité .....	2
I.2.1. Toxicité aigüe .....	2
I.2.2. Toxicité subaigüe .....	2
I.2.3. Toxicité sub-chronique .....	2
I.2.4 Toxicité chronique.....	3
I.3.La définition de la cytotoxicité .....	3
I.4.Irritation oculaire.....	3
I.4.1.Aspect clinique .....	3
I.4.2.Mécanisme étiopathologiques.....	4
I.4.2.1.Effet des produits tensio-actifs ou détergents .....	4
I.4.2.2.Altération du film lacrymal .....	4
I.4.2.3.Cytotoxicité cornéen .....	4
I.4.2.4.Les médiateurs de l'inflammation oculaire .....	5
I.5.Anatomie de l'œuf.....	5
I.6.Anatomie de l'œil.....	7
II. Les facteurs influençant la toxicité.....	8
II.1.La toxicité.....	8
II.2. La biotransformation .....	8
II.3.L'individu... ..	9
II.3.1.Facteurs génétiques.....	9
II.3.2.Facteurs physiologiques.....	9
a. Le sexe.....	9
b. L'âge .....	9
c. La grossesse .....	9
d. L'état de santé général .....	10
e. L'environnement.....	10
f. Les interactions .....	10
Addition .....	10



Synergie .....	11
Potentialisation.....	11
Antagonisme.....	12
III. Méthodes d'évaluation de la toxicité <i>in vitro</i> .....	13
III.1 Règle des 3R : Réduire, Raffiner, Remplacer.....	13
A. Réduire.....	13
B. Raffiner.....	14
C. Remplacer.....	14
IV. Les alternatives aux tests d'irritabilité.....	15
IV.1. Test d'Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué (OCDE n°439)..	15
Principe du test.....	15
IV.2. Test de fixation du rouge neutre : Test de phototoxicité (OCDE n° 432) ...	15
Principe du test.....	16
IV.3. Test d'Eyetex.....	16
IV.4. Test sur œil de poulet isolé (OPI) (OCDE n° 438).....	16
Principe du test.....	17
V. Autres exemples de tests <i>in vitro</i> .....	18
V.1. Test d'Âmes mutation reverse sur bactéries (OCDE n° 471).....	18
Principe du test.....	18
V.2. Test de mutation génique sur cellules de mammifère (OCDE n° 476).....	18
Principe du test.....	18
V.3. Test de synthèse non programmé de l'ADN (OCDE n° 482).....	19
Principe du test.....	19
V.4. Test d'échange de chromatides-sœurs.....	19
Principe du test.....	20
V.5. Test d'aberration chromosomique <i>in vitro</i> sur cellules de mammifère.....	20
Principe du test.....	20
VI. Test de HET-CAM.....	22
VI.1. Test in OVO.....	22
VI.2. Propriétés de la membrane chorio-allontoïde.....	22
VII. Avantages et limites des méthodes <i>in vitro</i> .....	23
VII.1. Avantages.....	23
VII.2. Limites.....	23
VIII. Mise au point sur la méthode HET-CAM.....	24
VIII.1. Protocole HET-CAM (Arrêté officiel. 1996).....	24

Partie 1: Incubation des œufs.....	24
Partie 2: Culture ex ovo.....	24
Mise en évidence de la membrane CAM .....	25
la substance d'essai.....	26
Lecture.....	26
Évaluation numérique des lésions.....	27
Détermination du score.....	28
Expression des résultats.....	28
VIII.2.Résultats.....	28
VIII.2.1.Présentation des scores obtenus.....	28
VIII.2.2.Calcul des notations et classification des produits.....	31
VIII.3.Étude comparative au test de Draize.....	33
Conclusion.....	36
Référence	
Résumé	

## **Introduction**

L'utilisation de modèles animaux est essentielle pour décrypter le vivant. Aucune alternative à ce jour ne peut s'y substituer totalement. Même si les méthodes *in vitro* (sur cellule) ou *in silico* (modélisation informatique) jouent un rôle important dans de nombreux projets de recherche comme les activités biologiques de molécules, la génomique etc... Mais elles ne permettent pas, seules, de comprendre et de reproduire les interactions multiples des préparations ou de leurs principes actifs au sein d'un organisme vivant.

L'une des propriétés biologiques les plus importantes des produits de consommation, ainsi que de nombreuses matières premières, est la compatibilité locale avec les muqueuses. Jusqu'à présent, les tests *in vivo* normalisés sont acceptés par les autorités de santé publique comme valides pour estimer le potentiel d'irritation des produits chimiques et adaptés à l'évaluation des risques. Néanmoins, la discussion controversée sur les tests sur les animaux, et en particulier sur le test oculaire de lapin de Draize, s'intensifie dans le domaine public et scientifique. Des efforts ont donc été faits pour valider des tests *in vitro* efficaces et appropriés dans les industries internationales des cosmétiques au cours de la dernière décennie. L'un des tests *in vitro* les plus importants est le HET – CAM, le test sur la membrane chorioallantoïque des œufs de poule fécondés.

Dans ce mémoire nous avons choisi de faire un aperçu sur les techniques *in vitro* les plus utilisés, des progrès récents dans les alternatives au test d'irritation oculaire de Draize, avec la mise en lumière du test de la membrane chorioallantoïque (HET-CAM), une des méthodes *in vitro* représentatives pour évaluer l'irritation oculaire et la corrosion, nous parlerons de ses critères d'évaluation, mais aussi de sa méthodologie, les détails du protocole, les applications et leur statut de validation. Au vu de la situation sanitaire actuelle du pays et donc l'impossibilité de réaliser nous-mêmes ce test, nous nous contenterons donc de discuter les résultats de test HET-CAM obtenus pour 6 produits cosmétiques, réalisé au niveau du CHU de Constantine, et de les comparer aux classifications de ces mêmes produits, obtenus cette fois-ci par le test de Draize.

## **I. Généralité**

### **I.1. Toxicologie**

La toxicologie est la science qui étudie les effets néfastes sur les organismes vivants des poisons et de différentes substances chimiques et leurs différentes caractéristiques. Elle fait appel à plusieurs domaines scientifiques et s'intéresse à un grand nombre de secteurs de l'activité humaine : l'agriculture, l'alimentation, l'industrie pharmaceutique, l'environnement, les milieux de travail, etc. **(CSST, 2005)**

### **I.2. Toxicité**

La toxicité c'est l'ensemble des effets nocifs qu'un toxique peut provoquer à un organisme vivant. D'une autre expression c'est la capacité d'une substance chimique à produire des effets néfastes chez un organisme vivant. Ce qui fait de cette substance dangereuse. La toxicité d'une substance est en relation direct à la voie et la dose absorbé, le temps entre absorption et apparition des effets néfastes, l'organe cible, etc. **(CSST, 2005)**

Il existe 4 formes de toxicité : toxicité aiguë, toxicité subaiguë, toxicité sub-chronique et la toxicité chronique.

#### **I.2.1. Toxicité aiguë**

La toxicité aiguë est la toxicité induite lors d'une exposition unique à une substance toxique dans une durée qui ne dépasse pas les 24 heures. **(CSST, 2005)**

#### **I.2.2. Toxicité subaiguë**

La toxicité subaiguë est la toxicité induite lors d'une exposition répétée à une substance toxique dans une durée qui ne dépasse pas un mois et supérieur a 24 heures. **(CSST, 2005)**

#### **I.2.2. Toxicité sub-chronique**

La toxicité sub-chronique est la toxicité induite lors d'une exposition à une substance toxique d'une façon répétée dans une durée de un et trois mois. **(CSST, 2005)**

#### I.2.2.4. Toxicité chronique

La toxicité chronique est la toxicité induite lors d'une exposition répétée pour une durée supérieure à trois mois à une substance toxique. (CSST, 2005)

**Tableau I:** Les formes d'intoxication

FORME D'INTOXICATION	FRÉQUENCE D'ADMINISTRATION	DURÉE DE L'EXPOSITION
AIGUË	Unique	< 24 heures
SUBAIGUË	Répétée	≤ 1 mois
SUBCHRONIQUE	Répétée	de 1 à 3 mois
CHRONIQUE	Répétée	> 3 mois

#### I.3. La définition de la cytotoxicité

Une substance cytotoxique est toute substances nocives pour les cellules, donc c'est celle ayant la propriété de les détruire (exemple : un médicament cytotoxique), et donc elle est capable d'altérer les structures et / ou les processus fondamental pour la survie cellulaire, la prolifération et / ou la fonction. (EKWALL, 1983).

#### I.4. Irritation oculaire

L'irritation oculaire désigne l'ensemble des dommages qui peuvent arriver lors de l'application de la substance d'essai à la surface antérieure de l'œil, elle est habituellement réversible après 21 jours. La corrosion des yeux est associée à l'apparition de l'ensemble des dommages irréversibles affectant l'œil. (OECD. Test N°. 405, 2012).

##### I.4.1. Aspect Clinique

Plusieurs composés chimiques peuvent causer des troubles et des irritations oculaires suite à une projection (exposition) directe ou par émanation de vapeurs. L'intensité de l'atteinte oculaire est relative aux propriétés physico-chimiques de l'agent et la durée de contact.

La symptomatologie est très variable d'un simple tableau clinique : de corps étranger, sensation de brûlure, de sécheresse, photophobie, larmoiement, vision fluctuante, rougeur

oculaire. Vers une corrosion de la surface oculaire dont le pronostic est très défavorable (GILLION et al. 2012).

Au début, une rougeur de la conjonctive peut apparaître à cause de l'injection vasculaire et des larmes apparaissent. Si l'irritation est sévère, une congestion et un œdème du tissu conjonctif apparaîtront par la suite. L'endothélium et l'épithélium, qui sont responsables du maintien de l'hydratation du stroma vont essayer de garder l'excès d'eau.

L'atteinte de la cornée, quant à elle proportionnelle à celle de l'épithélium cornéen : si elle est partielle, sa régénération se fera en quelques jours et sans séquelles. C'est souvent le cas après l'action de solvants organiques. Par contre si l'endothélium coréen est touché, il peut y avoir une perte définitive de la vue.

#### **I.4.2. Mécanisme étiopathologiques**

Les substances chimiques agressives agissent sur l'œil selon des mécanismes différents qui dépendent du toxique. Les prédominants mécanismes physiopathologiques sont :

##### **I.4.2.1. Effet des produits tensio-actifs ou détergents**

Ces produits sont capables d'altérer la tension de surface des membranes cellulaires et s'insèrent au sein de la bicouche phospholipidique ou les composants présentent les mêmes propriétés biochimiques. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties de polarité différente, l'une lipophile (soluble dans les matières grasses) et apolaire, l'autre hydrophile (soluble dans l'eau) et polaire. Les détergents les plus agressifs peuvent affecter l'ensemble de la cornée jusqu'à l'endothélium et provoquer un descemetocèle dans de rares cas (MAURER et PARKER, 2000).

##### **I.4.2.2. Altérations du film lacrymal**

Les toxiques sont capables de dissoudre la couche lipidique du film lacrymal par des intensités différentes suite à leurs propriétés physico-chimiques. Cela conduit à une rupture rapide du film lacrymal facilitant l'évaporation de l'eau et produisant une sécheresse oculaire.

##### **I.4.2.3. Cytotoxicité cornéen**

Des changements morphologiques de la cornée telle qu'une disparition totale ou partielle des microvillosités ou la coupure des jonctions intercellulaire accroît la perméabilité et la pénétration des solutions ioniques, des substances lipophiles et des

microorganismes. Les résultats peuvent être sérieux : épaissement de la cornée, atteinte de l'endothélium, opacité cornéenne.

#### **I.4.2.4. Les médiateurs de l'inflammation oculaire**

Plusieurs cytokines inflammatoires sont retrouvées dans les larmes, dans les deux états pathologiques et normaux :

L'IL-6 et l'IL-8 sont présent dans les larmes normales (NAKAMURA et al, 1998). L'IL-6 a aussi été retrouvée à des niveaux plus élevés dans les larmes de patients avec un syndrome de Sjögren par rapport aux yeux normaux.

Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont retrouvées à des niveaux élevés dans l'œil sec, comme la MMP-9 matricielle, une enzyme qui clive le précurseur de l'IL-1 $\beta$  en sa forme active.

Ces médiateurs sont corrélés avec la prise de fluorescéine mais ne peuvent pas discriminer entre les maladies des glandes de Meibomius et le syndrome de Sjögren, probablement parce qu'ils ont pour origine, au moins pour une partie, l'épithélium conjonctival (SOLOMON et al, 2001).

Une activité élevée des plasmines a aussi été retrouvée dans les larmes de patients avec un syndrome de Sjögren, suggérant une activité protéolytique importante probablement associée aux réactions inflammatoires dans les glandes lacrymales et/ou les cellules de la surface oculaire (VIRTANEN et al, 1997).

### **I.5. Anatomie de l'œuf**

La poule possède des cellules reproductrices très complexes qui peuvent mener à la création d'une vie. L'albumen inclus par les membranes de la coquille entoure le jaune d'œuf et protège cette vie potentielle. Un œuf est une cellule unique jusqu'à ce qu'elle soit fécondée.

L'œuf est composé de :

#### **I.5.1. Coquille d'œuf**

La surface extérieure dure de l'œuf est la coquille offre une protection à la partie intérieure de l'œuf.

#### **I.5.2. Matrice de la coquille**

Structure vésiculaire protéinée semi-transparente entre la cuticule et les membranes de la coquille, qui s'appelle matrice de coquille d'œuf.

### I.5.3. Membrane de la coquille

Les membranes de la coquille se trouvent entre la coquille d'œuf et le blanc d'œuf. Protègent l'embryon et toutes les structures qui le soutiennent.

### I.5.4. Chambre à air

C'est l'espace entre l'extérieur et les membranes internes de la coquille à l'extrémité émoussée de l'œuf, où la coquille est la plus poreuse et l'air peut facilement pénétrer.

### I.5.5. Chalaze

Le jaune de l'œuf est suspendu dans le blanc d'œuf par deux tissus en spirale appelées chalaze. Les chalazes maintiennent fermement le jaune dans le centre de l'œuf.

### I.5.6. Membrane vitelline

L'espace qui renferme le jaune est appelé membrane vitelline. Cette membrane a des couches intérieure et extérieure. La couche intérieure est transparente, encercle le blastodisque avec du jaune. La couche extérieure est blanchâtre.

### I.5.7. Disque germinal

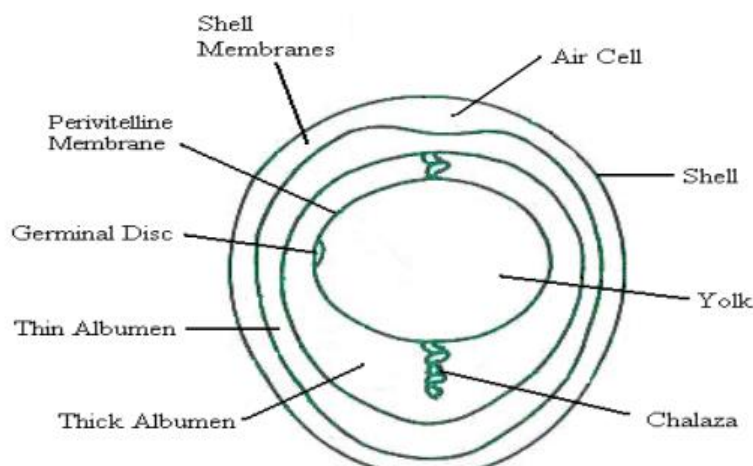
Au niveau de la surface du jaune, le disque germinal est entouré d'une membrane vitelline interne. Ceci est un petit disque cytoplasmique contenant l'ADN et des molécules de l'ovule. Le disque germinal ou blastodisque est visible à l'œil nu, apparaissant en surface du jaune comme un point blanc.

### I.5.8. Blanc d'œuf (albumen)

Liquide cytoplasmique transparent contenu dans l'œuf.

### I.5.9. Jaune d'œuf

C'est la partie qui sert de source de nourriture pour le développement embryonnaire. (Md. Anisur Rahman, 2013)



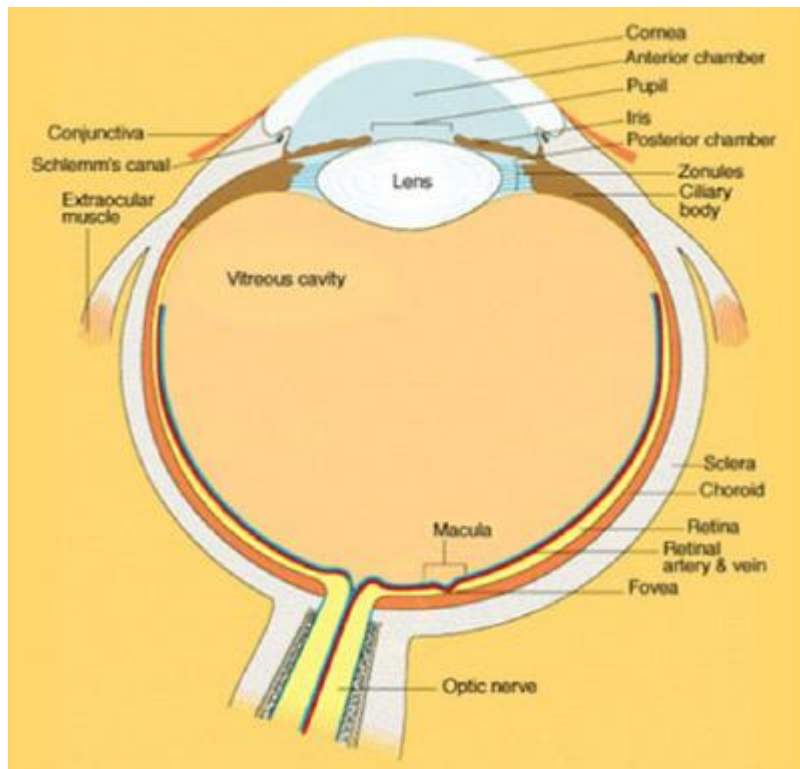
**Figure 1:** Constitution d'un œuf. (Teshager Dubie et al, 2014).



### I.6. Anatomie de l'œil :

L'œil humain normal mesure environ 22 à 27 mm de diamètre antéropostérieur et 69 à 85 mm de circonférence. Le globe oculaire humain se compose de trois couches primaires, chacune de ces trois couches étant sub-divisible. Les trois couches primaires et leurs subdivisions respectives comprennent:

1. la couche de support la plus externe de l'œil, qui consiste en une cornée claire, une sclère opaque et leur zone d'interdigitation, désignée sous le nom de limbe.
2. la couche uvéale moyenne de l'œil, constituant la couche vasculaire centrale du globe, qui englobe l'iris, le corps ciliaire et la choroïde.
3. la couche intérieure de l'œil, communément appelée rétine. (Barry D. Kels, 2015)



**Figure 2:** Anatomie de l'œil. (Barry D. Kels et al , 2015).

## II. Les facteurs influençant la toxicité

La quantité du toxique, la durée d'exposition et les différents facteurs physiologiques, environnementaux et pathologique affect la toxicité d'une substance. Comme à travers l'ADME (absorption, distribution, métabolisation et l'élimination) elle peut modifier son effet toxique. La toxicité et l'effet toxique sont influencé par plusieurs facteur comme: (BENSAKHRIA, 2018)

### II.1. La toxicité

Le degré de toxicité n'est pas le même pour toute les substances. Certains sont largement plus toxiques que d'autres, cette variation de toxicité peut être expliquée en partie par les différences qui existent entre la structure chimique des substances. Ces différences peuvent affecter la capacité des substances à perturber le fonctionnement de l'organisme (exemple figure 1). (CSST, 2005)

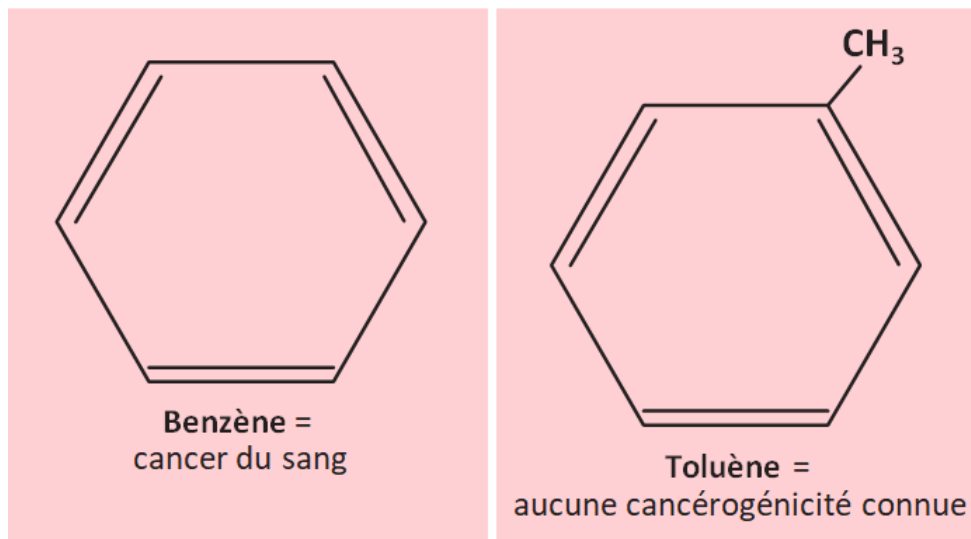


Figure 3: Structure chimique et effet

D'autre partie elle peut être expliqué par les caractéristiques physico-chimiques (la grosseur des poussières, la volatilité et la solubilité dans l'eau, pH,... etc.)

### II.2. La biotransformation

Le terme "biotransformation" représente l'ensemble des modifications chimiques que subissent les xénobiotiques (toxiques, médicaments,... etc.) dans l'organisme pour donner naissance à des métabolites. Les biotransformations sont principalement effectuées par réactions enzymatiques. Un xénobiotique peut subir multiples biotransformations qui aboutissent à la formation de plusieurs métabolites. (MENNIER, 2020)

### **II.3. L'individu**

Il existe une grande variabilité entre les individus vu que la population humaine est un group hétérogène. Ce qui veut dire que l'effet toxique pour une même dose d'un toxique peut être différent selon l'hôte exposée à ce dernier. La nature et l'intensité de ces effets toxiques est due à deux principales catégories. (CSST, 2005 .BENSAKHRIA, 2018)

#### **II.3.1. Facteurs génétiques**

Cette variation dans l'activité pharmacologique et toxicologique est en générale due à la variabilité de l'emplacement physique du gène (l'allèle) ce qui provoque un changement dans les protéines impliquées dans le devenir des substances (enzymes métaboliques – protéines de transport) (BENSAKHRIA, 2018).

#### **II.3.2. Facteurs physiologiques**

##### **a. Le sexe**

Concernant la métabolisation des toxiques il y a une différence entre les femelles et les males. (CSST, 2005) Comme dans le cas du Paraoxon (métabolite du Parathion) on trouve que les rats sont moins sensibles que les rates (BENSAKHRIA, 2018).

##### **b. L'âge**

Communément les personnes âgées et les enfants sont plus sensibles aux effets toxiques que le reste des tranches d'âge. Par exemple on observe une absorption plus facile chez les jeunes enfants que les adultes (jusqu'à 40 fois de plus pour le cadmium) (CSST, 2005), (BENSAKHRIA, 2018).

##### **c. La grossesse**

Au cours de la grossesse des modifications de l'activité métabolique se produit chez la femme ce qui résulte que le processus de métabolisation des toxiques sera affecté (CSST, 2005).

**d. L'état de santé général**

Les individus qui souffrent de maladies hépatiques ou rénales résistent moins que ceux qui sont en bonne santé, car ils métabolisent et éliminent les toxiques plus facilement (CSST, 2005).

**e. L'environnement**

Les facteurs environnementaux, ce sont les éléments extérieurs à l'individu qui peuvent modifier les effets d'un toxique et même avoir un effet sur sa toxicité comme la lumière, la température, l'altitude... etc.

L'exposition aux mélanges de produits chimiques en milieu professionnel est un des problèmes les plus importants qu'il faut prendre en considération.

L'exposition simultanée à ces mélanges de produits qui sont souvent complexes et formé de produits de transformation, de composés similaires, de produits de réaction ou de résidus (déchets) peut entraîner des réponses inattendues qui peuvent différer de la réponse causées par chacun des composants du mélange administré séparément (CSST, 2005).

**f. Les interactions**

Plusieurs termes existent pour décrire les interactions toxicologiques qui sont: l'addition, la potentialisation, la synergie et l'antagonisme (CSST, 2005), (BENSAKHRIA, 2018).

**• Addition**

Il n'y a pas d'interaction, la somme des réponses des substances prises individuellement est égale à la réponse obtenue lors d'une administration simultanée des substances (toxique) (CSST, 2005).

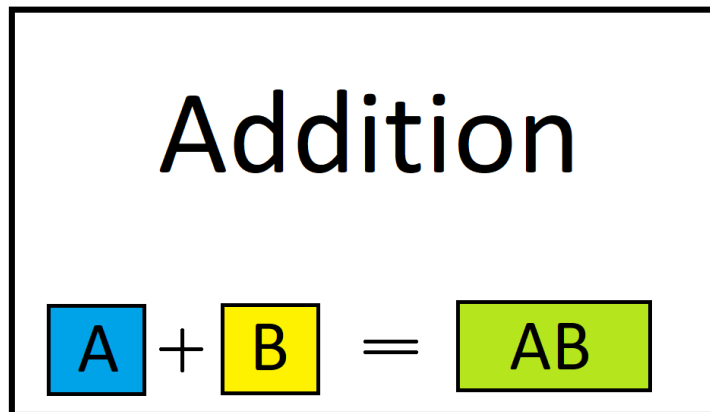


Figure 4: L'addition

- **Synergie**

La somme des réponses des substances prises individuellement est inférieure à la réponse obtenue quand les substances sont prises au même temps (CSST, 2005).

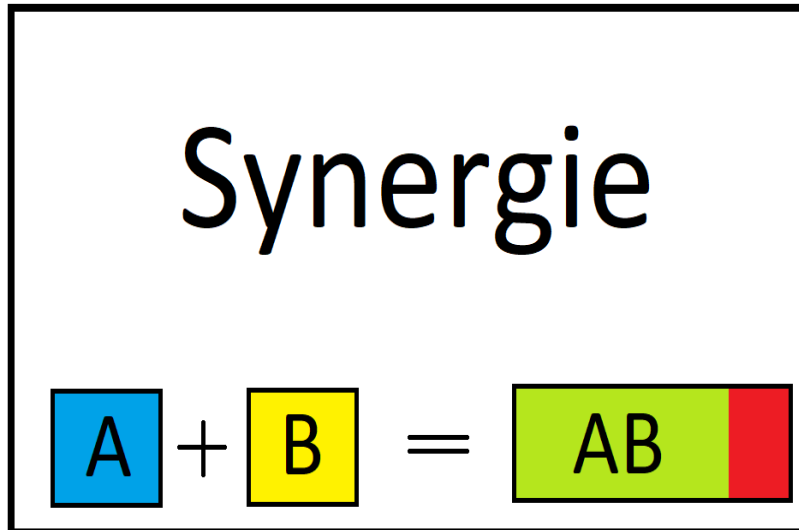


Figure 5: La synergie

- **Potentialisation**

Elle se produit lorsque la réponse de la substance (le toxique) sera augmentée par une autre substance qui n'est pas forcément toxique (peu ou pas toxique) (BENSAKHRIA, 2018).

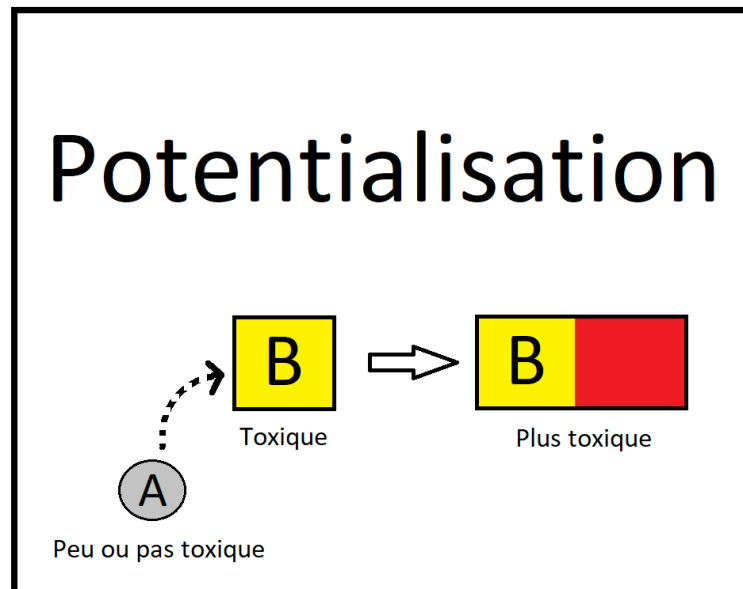
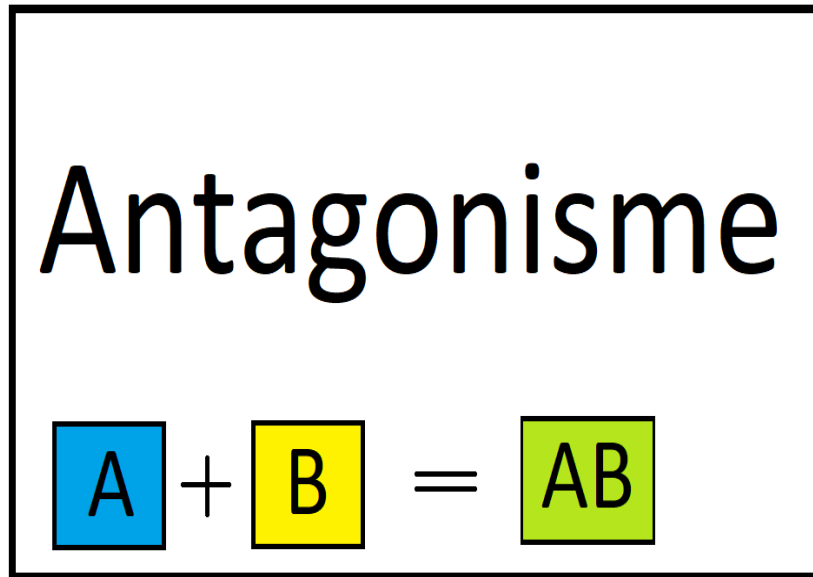


Figure 6: La potentialisation

- **Antagonisme**

La somme des réponses obtenue lors d'une administration individuelle des substances est supérieure à la réponse obtenue dans une administration simultanée (CSST, 2005).



**Figure 7:** L'antagonisme

### **III. Méthodes d'évaluation de la toxicité *in vitro***

La recherche animale étudie des organismes vivants. Elle a permis les progrès de la connaissance et de la médecine et reste indispensable pour protéger la santé des hommes et des animaux. Elle est utilisée en recherche fondamentale, dans la recherche sur les maladies et sur les médicaments. Cela dit, l'éthique est au cœur des préoccupations en recherche. Elle utilise les connaissances et les compétences pour augmenter l'information obtenue et pour diminuer le nombre d'animaux utilisés, les contraintes et œuvre pour la mise en place dans la mesure du possible, d'un maximum de méthodes basées sur des tests *in-vitro*. Elle s'appuie sur le principe des **3R** et sur les comités d'éthique.

#### **Règle des 3R: Réduire, Raffiner, Remplacer**

Comme son nom l'indique elle est constitué de 3 éléments : Réduire, Raffiner, Remplacer, ces appellations ont été utilisées par Russell W.M.S et Burch R.L en 1959. C'est l'une des principales formes de l'éthiques qui représente les bonnes pratiques qu'on doit respecter en expérimentation animale et dans la recherche scientifique (**ACADÉMIE NATIONAL DE PHARMACIE, 2017**).

Elle est anticipée par les scientifiques eux-mêmes, qui illustrent en cela la phrase de Jean-Bernard : " Tout ce qui n'est pas scientifique n'est pas éthique "(**ACADÉMIE NATIONAL DE PHARMACIE, 2017**).

#### **A. Réduire**

C'est la réduction du nombre d'animaux utilisé dans l'expérimentation, ceci peut être réalisé par différentes méthodes :

- Utilisé le maximum d'informations collecté depuis des expérimentations similaire
- Utilisé les animaux seulement quand il en est nécessaire c'est-à-dire dans les expériences qui sont jugé importantes.
- Élaboration d'un protocole expérimental pour but d'obtention de résultats satisfaisant qui conduisent a une conclusion valable et évité la répétition des expérimentations déjà faite.
- Utilisation des méthodes statistique pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire a l'obtention des résultats désiré (**MICHAEL et FESTING, 1994**).

### B. Raffiner

Ce qu'on veut dire par raffiner c'est diminuer ou éviter la douleur et la souffrance infliger aux animaux par les manipulations expérimentales et obtenir d'avantage d'informations convenable a la recherche effectuée sans faire souffrir l'animal (**La règle des 3 R, INSERM, 2020**). L'administration d'analgésiques est nécessaire lorsque l'expérimentateur effectue une manœuvre qui va certainement mettre l'animal en détresse et en douleur (**FLECKNELL, 1994**).

Optimiser la méthodologie appliquée aux animaux, notamment les conditions de transport, élevage, hébergement, utilisation (**INERIS, 2011**).

### C. Remplacer

C'est l'action de remplacer à chaque fois que cela est possible le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro* ou "*in silico*" modèles mathématiques, bioinformatique. Les masses et plusieurs organisations de protection des animaux sont entrains d'encourager ces techniques alternatives pour limiter voir même mettre un terme a l'utilisation des animaux dans la recherche scientifique (**La règle des 3 R, INSERM, 2020**).



## IV. Les alternatives aux tests d'irritabilité

### IV.1. Test d'Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué (OCDE n°439)

L'irritation cutanée est une forme de lésions qui apparait après exposition à une substance chimique, des manifestations sous formes d'œdème et érythème sont constaté, une forte exposition conduit a la pénétration du composant chimique à travers la première couche de la peau ou ce dernier exerce des effets toxiques qui mène a la lésions des kératinocytes et plusieurs effets cytotoxiques au niveau de la peau (OCDE N° 439, 2013).

- **Principe du test**

Le produit chimique est appliqué sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, formé à partir de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour donner un modèle multicouche très différencié d'épiderme humain.

Ce modèle est constitué de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un stratum corneum multicouche qui contient des couches lipidiques lamellaires intercellulaires qui représentent les principales classes de lipides, la même que l'on observe *in vivo*, les cellules mourantes à cause des effets toxique peuvent soit rejeter des médiateurs de l'inflammation ou induire la cascade inflammatoire qui agit aussi sur les cellules du derme, en particulier les cellules stromales et endothéliales des vaisseaux sanguins. C'est la dilatation et la perméabilité accrue des cellules endothéliales qui sont responsables des érythèmes et des œdèmes observés Les produits chimiques irritants sont mis en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé ( $\leq 50$  %, pour la catégorie 2 du SGH de l'ONU). En fonction du cadre législatif et de l'applicabilité de la présente Ligne directrice, les produits chimiques testés produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants ( $> 50$  %, sans catégorie) (OCDE N° 439, 2013).

### IV.2. Test de fixation du rouge neutre : Test de phototoxicité (OCDE n° 432)

La phototoxicité est une réaction à effets toxiques causée par des produits chimiques photoréactifs administrés par voie topique ou systémique, après exposition du corps à la lumière. Le test de phototoxicité *in vitro* « fixation du colorant vital rouge neutre » permet de déterminer le pouvoir phototoxique d'un produit chimique qui survient à cause de l'excitation après exposition à la lumière (OCDE N° 432, 2004).

- **Principe du test**

La comparaison de la cytotoxicité d'un produit chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique de lumière solaire est sur quoi se base le test de phototoxicité *in vitro*. Dans ce test, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre 24 heures après traitement par le produit chimique mis à l'essai et irradiation. Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui a la capacité de pénétrer facilement dans les membranes cellulaires par non-diffusion, et peut s'accumuler à l'intérieur de la cellule dans les lysosomes. Si la membrane cellulaire ou les lysosomes sont endommagés par une substance chimique irritante, la teinture s'échappe par les membranes perméables (OCDE N° 432, 2004).

### IV.3. Tests d'Eyetex

Le système de test EYETEX est un test *in vitro* qui est basé sur la turbidité produite dans un tube d'essai. Il ne nécessite pas d'animaux ou une culture de tissu, bien que le matériel soit d'origine biologique.

Les échantillons sont incubés avec un Réactif EYETEX qui lie les produits chimiques qui sont potentiellement toxiques pour les yeux. Le réactif est une poudre lyophilisée contenant des protéines, des glycoprotéines, des mucopolysaccharides, des sels et un tampon ; la composition exacte de ce réactif est exclusive. La poudre est reconstituée par addition d'eau distillée à 0,1 % (poids par volume) d'Azoture de sodium comme conservateur pour produire un réactif concentré. Les irritants chimiques entraînent une agrégation et l'irritation chimique de l'échantillon d'essai peut être classé selon le degré d'opacité produite. Cela peut être comparé aux opacités produites par les irritants connus avec irritation légère, modérée et sévère (ANDERSON, 1990).

### IV.4. Test sur œil de poulet isolé (OPI) (OCDE n° 438)

Le comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis avec l'aide du centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) et le centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM) ont mis on œuvre une méthode pour dépister les produits chimique qui ont la capacité de provoquer des lésions oculaires. Le test OPI exhibe une précision de 83 % et un taux de faux positifs de 7 % et aussi un taux de faux négatifs de 47 % (OCDE N° 438, 2013).

- **Principe du test**

La détermination du gonflement, de l'opacité et de la rétention de fluorescéine de la cornée est la manière de déterminer les dégâts causés par le produit chimique testé. On utilise dans cet essai des yeux prélevés sur des poulets tués en abattoirs pour la consommation humaine, et les animaux de laboratoire sont donc inutiles. On utilise uniquement des yeux d'animaux sains dont l'entrée dans la chaîne alimentaire humaine est autorisée. Le gonflement de la cornée est une mesure quantitative, tandis que l'opacité, la rétention de fluorescéine et les changements histopathologiques sont des examens qualitatifs. Chaque mesure est reportée sous forme d'un score quantitatif utilisé pour assigner une catégorie OPI (1 à 4), ou associée à une catégorie qualitative utilisée pour assigner une catégorie de produit chimique dangereux pour l'œil *in vitro* (OCDE N° 438, 2013).

## V. **Autres exemples de tests *in vitro***

Les méthodes *in vitro* ne se limitent pas qu'aux tests de l'irritabilité, il existe aussi des techniques permettant d'étudier la mutagénicité des produits, en voici quelques exemples.

### V.1. **Test d'Ames mutation reverse sur bactéries (OCDE n° 471)**

Les tests de mutation réverse sur les bactéries sont pratiqués sur les souches d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Leur but est de détecter des mutations ponctuelles issues de la substitution, l'addition ou la délétion des bases de l'ADN. Les mutations ponctuelles sont la cause de plusieurs maladies génétiques humaines. Les tests de mutation réverse sur les bactéries sont rapides, pas chers et faciles à réaliser (OCDE N° 471, 1997).

- **Principe du test**

La substance de l'essai est ajoutée dans une boîte pétrie où les bactéries sont en suspension en présence et aussi en l'absence d'un activateur métabolique exogène. Dans la méthode par étalement (incorporation directe) les bactéries sont émergées avec une couche d'agar de surface et sont ensuite déposées sur un milieu défini. Quant à la méthode de pré-incubation, le mélange de traitement est incubé et ensuite fusionné avec une couche d'agar de surface avant l'étalement sur un milieu défini. Dans les deux cas, après deux ou trois jours d'incubation, les colonies revenantes sont comptées et leur nombre est comparé à celui des revenants spontanés dans les boîtes témoins traités avec le solvant (OCDE N° 471, 1997).

### V.2. **Test de mutation génique sur cellules de mammifère (OCDE n° 476)**

Le test de mutation génétique sur les cellules de mammifères a pour but de détecter des mutations induites par des produits chimiques. Les cellules employées nous permettent de mesurer les mutations directes sur les gènes hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transférase "test HPRT" et le transgène de la xanthine-guanine-phosphoribosyl transférase (GPT) aussi nommé "test XPRT", les deux tests détectent différentes catégories d'effets génétiques. Le test XPRT est moins utilisé que le test HPRT à des fins réglementaires (OCDE N° 476, 1997).

- **Principe du test**

Des cellules mutantes qui ont un manque en HPRT dans le test HPRT ou en XPRT dans le test XPRT peuvent résister aux effets cytostatiques de la 6-thioguanine "TG" un

analogue de la purine. Les cellules munies de GPT (dans le test XPRT) sont sensibles à la TG. Ceci résulte à l'inhibition du métabolisme et arrêt de la division cellulaire, les cellules mutantes prolifèrent grâce à la TG alors que les cellules non mutantes ne prolifèrent pas. La cytotoxicité est déterminée par la mesure de la survie relative (OCDE N° 476, 1997).

### V.3. Test de synthèse non programmé de l'ADN (OCDE n° 482)

Ce test permet la détection *in vitro* de synthèse d'ADN de réparation dans des cellules primaires ou des lignées cellulaires établies. L'effet est mesuré par le taux d'incorporation d'un nucléotide tritié par exemple 3 H-TdR, à l'aide de techniques d'autoradiographie ou de comptage en scintillation liquide (LCS). L'UDS peut également être mesuré en utilisant des systèmes *in vivo* (OCDE N° 482, 1986).

- **Principe du test**

Le test de synthèse non programmée de l'ADN détermine le volume de la synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant la région lésée par des éléments chimiques ou physiques. Ce test repose sur l'incorporation du 3 H-TdR « thymidine tritiée » dans l'ADN des cellules de mammifères qui ne sont pas dans la phase S du cycle cellulaire. On peut définir l'incorporation de 3 H-TdR en examinant, par autoradiographie ou par comptage en scintillation liquide, l'ADN provenant de cellules traitées (OCDE N° 482, 1986).

### V.3. Test d'échange de chromatides-sœurs

Le test d'échange de chromatides-sœurs a pour but de détecter les échanges réciproques d'ADN entre deux chromatides sœurs d'un chromosome en phase de dédoublement. Le test représente l'échange réciproque de produits de réplication de l'ADN à des locus homologues. L'échange implique une réunion et une cassure de l'ADN. Pour détecter des échanges de chromatides sœurs, il est nécessaire de marquer différemment les chromatides sœurs ; c'est faisable par l'incorporation de bromodéoxyuridine " BrdU " dans l'ADN chromosomique pendant deux cycles cellulaires. L'échange de chromatides sœurs peut être détecté dans des cellules de mammifère et dans des systèmes de non-mammifères (OCDE N° 479, 1986).

- **Principe du test**

Les cellules de mammifère *in vitro* sont exposées à la substance à étudier en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène de mammifère et mises en culture durant deux cycles de réplication dans un milieu contenant de la BrdU. Après traitement avec un inhibiteur du fuseau (par ex. colchicine) pour le simple but d'accumuler les cellules en phase de mitose de type métaphasique (c-métaphase), les cellules sont réunies et les chromosomes sont préparés (OCDE N° 479, 1986).

#### V.6. Test d'aberration chromosomique *in vitro* sur cellules de mammifère

Ce test détecte les substances qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules de mammifère cultivées. Il existe deux types d'aberrations structurales : chromosomiques ou chromatidiques. Le test est pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies ou des cultures cellulaires d'origine humaine ou d'origine animale (rongeur). Les cellules employées sont choisies selon leur potentiel de croissance, la stabilité de leur caryotype (notamment leur nombre de chromosomes) et de la fréquence spontanée des aberrations chromosomiques (OCDE N° 473, 2014).

- **Principe du test**

Des cultures cellulaires d'origine humaine ou animal sont exposé à l'élément chimique que l'on désire tester, ceci est fait en présence et en absence d'une source exogène d'activation métabolique. Après l'exposition à l'élément chimique testé les cellules sont traité par un agent qui bloque la métaphase (exemple : colchicine ou le Colcemid), récoltées et teintées, les cellules sont observées par microscope pour détecter les aberrations chromatidiques et chromosomiques (OCDE N° 473, 2014).

## VI. Test de HET-CAM

Le HEN'S EGG TEST (HET) ou test de l'œuf de poule est bien connu comme test de base pour l'embryotoxicité et pour les aspects spéciaux de la toxicité systémique et de l'immunopathologie, le test d'embryotoxicité HET a été étendu et normalisé en tant que test de membrane HET-chorioallantoïque (CAM) pour l'irritation des membranes. La CAM des œufs fertiles incubés pendant 10 jours est une membrane vasculaire vitale, dans laquelle des effets irritants peuvent être observés après une exposition à des matériaux d'essai liquides ou solides. Les effets HET CAM sont notés et classés pour donner des évaluations des risques analogues à celles du test de l'œil de lapin de Draize. Il existe une bonne corrélation entre les classifications basées sur les observations HET-CAM (y compris la microscopie électronique) et les données rapportées des tests de Draize (**LUEPKE et KEMPER, 1986**).

La variété croissante et le grand nombre de produits chimiques introduits sur le marché et également dans l'environnement chaque année, et les exigences qui en résultent pour la protection de la santé humaine et de l'environnement humain, ont nécessité la surveillance des matériaux environnementaux et des banques de spécimens ainsi que la mise au point de méthodes rapides et fiables d'évaluation de la toxicité et de l'évaluation des risques. Néanmoins, les obligations éthiques et légales, telles que les lois sur la protection des animaux, doivent également être prises en compte. Les modèles d'embryons de poulet sont bien connus et sont recommandés pour les enquêtes de dépistage dans les tests de développement embryonnaire et d'embryotoxicité. Ils présentent de nombreux avantages, mais il existe également des inconvénients qui doivent être reconnus. Les avantages de base ont été standardisés et étendus dans notre laboratoire ces dernières années, grâce au développement du Hen's Egg Test (**LUEPKE et KEMPER, 1986**).

Le HET fournit des informations sur l'embryolétalité, la croissance et le développement embryonnaire, la tératogénicité et la toxicité systémique, y compris les aspects immunopathologiques et les voies métaboliques. Le HET a maintenant été étendu, par le développement du test de membrane chorioallantoïde HET (test HET-CAM), comme une alternative au test oculaire de lapin Draize *in vivo* pour la détection des irritants membranaires. En considérant la "réduction, le raffinement et le remplacement " de l'expérimentation animale, il est très important de reconnaître que le test des œufs de poule incubés est un cas limite entre les systèmes *in vivo* et *in vitro* et n'entre pas en conflit avec les aspects éthiques et juridiques, en particulier les lois sur la protection des animaux (**LUEPKE et KEMPER, 1986**).

### VI.1. Test *in OVO*

Des modèles d'œufs aviaires ont été développés comme alternatives aux tests de génotoxicité *in vivo* utilisés pour étudier le potentiel génotoxique ou cancérigène des produits chimiques qui se sont avérés positifs dans les tests de génotoxicité *in vitro*. Les tests disponibles comprennent le test de cancérogénicité *in ovo* (IOCA), qui évalue l'induction de lésions pré-néoplasiques hépatiques dans les œufs de dinde ; le test de HEN'S EGG (HET-MN) pour surveiller l'induction du micronoyau érythrocytaire par des produits chimiques; le test de génotoxicité des œufs de dinde (TEGA) et le test de génotoxicité des œufs de poule (CEGA) connexe, qui mesurent les dommages à l'ADN du foie (KOBESTA et al, 2018).

### VI.2. Propriétés de la membrane chorio-allantoïde

Cette membrane est un tissu complet comprenant des artères, des capillaires et des veines, et il est techniquement facile à étudier. Grâce à cette méthode, les produits chimiques sont placés en contact direct avec la membrane chorio-allantoïde de l'œuf de poule. Les modifications des lésions vasculaires (hémorragie, lyse ou coagulation) sont des indications du potentiel du produit chimique à endommager les muqueuses *in vivo* (BUDAI et al, 2010).

La membrane chorio-allantoïde est capable de démontrer les puissances irritantes des substances chimiques sur les muqueuses des membranes de l'œuf (LEUPKE, 1985).



VII. Avantages et limites des méthodes *in vitro*

VII.1. Avantages

- La capacité d'exposé les cellules directement aux produit chimiques.
- La capacité de manipulé les conditions environnementale pour augmenter, bloquer ou moduler les réponses cellulaire.
- Évaluation de la réponse intrinsèque des cellules aux produits chimiques.
- suivre avec précision les phénomènes dans le temps.
- Explique le mécanisme d'action.
- Multiplier les essais
- Limité le nombre d'animaux d'expériences: avantage éthique
- Les essais sur des cellules humaines permettent d'éviter la différence d'espèce  
(FRANK, 1991 , HARRY et al, 1998)

VII.2. Limites

- Effet des propriétés chimiques sur la biodisponibilité (solubilité, volatilité, précipitation).
- Altération des paramètres du milieu de culture par l'interaction direct avec les produits chimique (pH, osmolarité, liaison protéique).
- Absence des mécanismes de filtrage *in vivo*.
- Les cellules en cultures ne rendent pas compte de la complexité de l'organisation du vivant dans sa globalité, donc elles ne reflètent pas la réalité physiologique.
- L'incapacité d'établir une corrélation précise entre dose et toxicité (FRANK, 1991 HARRY et al, 1998).

## VIII. Mise au point sur la méthode HET-CAM

Etant donné la situation sanitaire difficile qu'a traversée le pays, nous étions malheureusement dans l'incapacité totale de mener nous-mêmes nos expérimentations, face à ce dilemme, nous avons choisi de faire une mise au point sur cette technique, mettre en lumière les différentes étapes de sa réalisation, mais aussi, en se basant sur les résultats de tests HET-CAM, réalisés au niveau du CHU de Constantine (service de toxicologie) dont il est propriétaire, sur plusieurs produits cosmétiques, nous en avons sélectionné 6 afin de les discuter .

### VIII.1. Protocole HET-CAM (Arrêté Officielle., 1996)

Nous tenons à préciser que ce protocole est le fruit des nombreux travaux dirigés par Pr.Belmahi, chef du service Toxicologie. CHU Constantine, nous ne sommes en aucun cas propriétaires des résultats qui vont suivre, ils appartiennent à leurs auteurs respectifs.

#### *Partie 1: Incubation des œufs*

les œufs fécondés peuvent être conservés à 13 ° C jusqu'à une semaine après les avoir reçus.

- Les œufs sont incubés pendant 72 heures, couchés horizontalement dans un incubateur avec un plateau mobile, en faisant tourner les œufs 12 fois par jour en continu.
- L'humidité est maintenue à 60 - 62%, la température d'incubation à 37,5 ° C. Remarque : Avant de commencer l'incubation, les saletés, les plumes et les excréments sont soigneusement éliminés des coquilles d'œufs mécaniquement par un essuyage à sec avec des essuie-tout en zigzag gris ordinaires, qui ont une structure de surface rugueuse plutôt que douce. Cependant, essuyer les œufs avec de l'éthanol ou un désinfectant pourrait réduire considérablement le taux de survie des embryons.

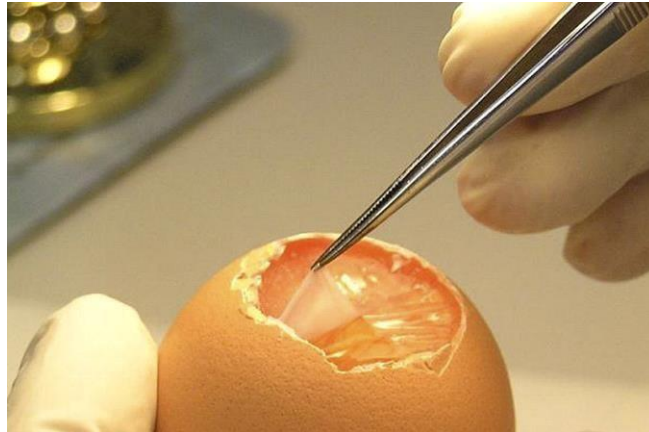
#### *Partie 2: Culture ex ovo*

Les œufs sont mirés au dixième jour et les œufs défectueux sont rejetés.

Durant le test, il est important d'utiliser une lumière d'une intensité suffisante qui ne dégage pas de chaleur pour éviter le dessèchement du MCA, les différentes étapes du test sont réalisées rapidement. Sinon, utilisez, par exemple, de la brume (brumificateur) pour humidifier l'air.

***Mise en évidence de la membrane CAM***

L'œuf étant placé verticalement sur un support (poche d'air vers le haut), la coquille est entaillée au niveau de la poche d'air en prenant soin de ne pas léser la MCA. À l'aide d'une pince ou d'une paire de ciseaux à bouts ronds, la coquille est enlevée jusqu'au niveau de la membrane coquillière.



**Figure 8:** Indication de la chambre à air (Laboratoire LIMSA)

A l'aide d'une solution isotonique de chlorure de sodium tiédi à 37 °C ,on va procéder à l'humidification de la surface de la membrane coquillaire.

La membrane coquillière est décollée délicatement à l'aide d'une pince, la membrane chorio-allantoïdienne est juste en dessous (sous-jacente).



**Figure 9:** Préparation de la CAM (Semantic scholar)

Les œufs présentant une membrane altérée et/ou avec des vessaux abimés ne sont pas conformes à la réalisation du test.

- L'effet irritant du produit à l'essai (ou de chacune de ses dilutions) est évalué sur trois œufs.

***La substance d'essai***

- 0,30 ml du produit à l'essai (pur ou dilué), maintenu à 37°C, sont alors déposés délicatement sur la MCA à l'aide d'une seringue ou d'une pipette.
- 0,3g en cas d'une substance solide (après transformation en une fine poudre), ou dans le cas de produits pâteux ou de crèmes.
- à la fin de l'application, le chronomètre est déclenché après 20 secondes de contact, la membrane est rincée avec 5 ml de soluté isotonique de chlorure de sodium (maintenu à 37 °C) à l'aide d'une seringue en évitant toute projection brutale.
- Le liquide de rinçage est éliminé par inclinaison de l'œuf.
- Les éventuels phénomènes d'irritation sont observés pendant 5 minutes selon la procédure décrite ci-après.
- Le temps exact d'apparition de chaque phénomène est relevé.

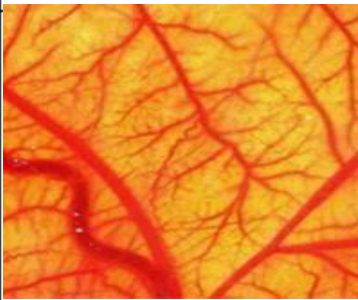
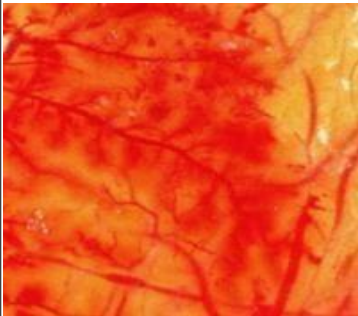
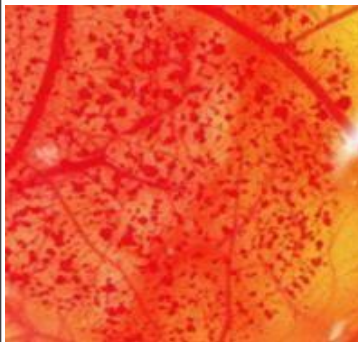
***Lecture***

Les observations prises en compte pour la notation du produit doivent être réalisées à l'œil nu.

Les phénomènes observés (hyperémie, hémorragie, coagulation) ne sont pas retenus en fonction de leur intensité mais en fonction de leur présence : il s'agit d'une réponse de type tout ou rien.

**Le temps est noté à l'apparition de chacun des phénomènes.**

Tableau II: Les phénomènes observés pendant les essais de HET-CAM

Phénomène	Description	
Hyperémie	Phénomène observé : des capillaires non visibles avant l'ajout du produit deviennent visibles, alors que les capillaires visibles se dilatent et deviennent plus rouges. Ce phénomène peut également affecter les vaisseaux de diamètre supérieur.	
Hémorragie	Phénomène observé : libération de sang s'échappant des vaisseaux et/ou des capillaires, pouvant se présenter sous différents aspects, et notamment en « chou-fleur », en nappe, en voile diffus, en piqueté (le sang s'échappe ponctuellement à différents endroits de la membrane). Il est à noter que : - l'hémorragie peut présenter un caractère éphémère ; elle doit néanmoins être prise en compte ; - l'observation, dans les 30 premières secondes, d'une hémorragie massive impose la prise en compte de l'hyperémie masquée.	
Coagulation (opacité et/ou thrombose)	<b>Opacité :</b> Phénomène observé : apparition sur tout ou partie de la membrane, soit d'un voile opalescent évoluant éventuellement vers une opacification, soit d'une opacification directe. Il est nécessaire de vérifier que le phénomène n'est pas lié au comportement physicochimique du produit en milieu aqueux (par exemple formation d'un colloïde, d'un précipité, ...). <b>Thrombose :</b> Phénomène observé : rupture du flux sanguin dans les vaisseaux se traduisant par un aspect segmenté (alternance d'étranglements et de zones turgescentes plus ou moins sombres). Il est à noter que les observations ne doivent pas prendre en compte les modifications intervenues au niveau des capillaires.	

### *Évaluation numérique des lésions*

Les phénomènes observés sont quantifiés selon le tableau ci-après, en fonction de leur délai d'apparition :

**Tableau III:** Les phénomènes observés et leurs scores selon le temps d'apparition

Phénomène	Temps	Score
Hyperémie	t inférieure ou égal à 30 s	5
	t supérieure à 30 s et inférieure ou égal à 2 min	3
	t supérieure à 2 min et inférieure ou égale à 5 min	1
Hémorragie	t inférieure ou égal à 30 s	7
	t supérieure à 30 s et inférieure ou égal à 2 min	5
	t supérieure à 2 min et inférieure ou égale à 5 min	3
Coagulation	t inférieure ou égal à 30 s	9
	t supérieure à 30 s et inférieure ou égal à 2 min	7
	t supérieure à 2 min et inférieure ou égale à 5 min	5

**Détermination du score**

Le score pour chaque œuf est la somme des notes d'hyperémie, d'hémorragie et de coagulation.

La notation du produit testé est la moyenne arithmétique, arrondie à une décimale des scores obtenus sur trois œufs. La notation maximum est de 21.

Le potentiel irritant sur la membrane chorio-allantoïdienne du produit à l'essai (pur ou dilué) est donné par l'échelle suivante :

**Expression des résultats****Tableau IV:** Expression des résultats selon la notation

Notation (N)	Classification
N inférieur à 1.	Pratiquement non irritant.
N supérieur ou égal à 1 et inférieur à 5.	Faiblement irritant
N supérieur ou égal à 5 et inférieur à 9.	Modérément irritant.
N supérieur ou égal à 9.	Irritant.

**Résultats****Présentation des scores obtenus**

Le tableau ci-dessous représente les scores obtenus selon le degré d'irritation des produits testés (Boughedda et Bendjaber.,2015)

Tableau V: Résultats des tests HET-CAM

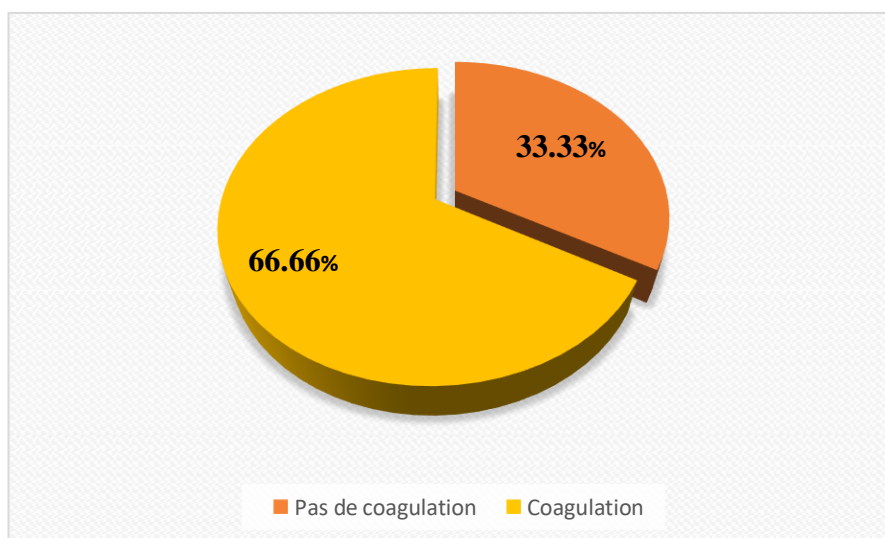
N°	Phénomènes		Temps d'apparition	Score	Score des œufs
1	E1	Hypémie	00 min 10 sec	5	19
		Coagulation	00 min 30 sec	9	
		Hémorragie	01 min 00 sec	5	
	E2	Hypémie	00 min 07 sec	5	19
		Coagulation	00 min 30 sec	9	
		Hémorragie	01 min 30 sec	5	
	E3	Hypémie	00 min 20 sec	5	17
		Coagulation	00 min 45 sec	7	
		Hémorragie	01 min 13sec	5	
2	E1	Hypémie	00 min 43 sec	3	8
		Coagulation	02 min 10 sec	5	
		Hémorragie	/		
	E2	Hypémie	00 min 45 sec	3	8
		Coagulation	02 min 30 sec	5	
		Hémorragie	/		
	E3	Hypémie	01 min 00 sec	3	10
		Coagulation	01 min 50 sec	7	
		Hémorragie	/		
3	E1	Hypémie	00 min 40 sec	3	3
		Coagulation	/		
		Hémorragie	/		
	E2	Hypémie	00 min 40 sec	3	3
		Coagulation	/		
		Hémorragie	/		
	E3	Hypémie	00 min 40 sec	3	3
		Coagulation	/		
		Hémorragie	/		

*VIII. Mise au point sur la méthode HET-CAM*

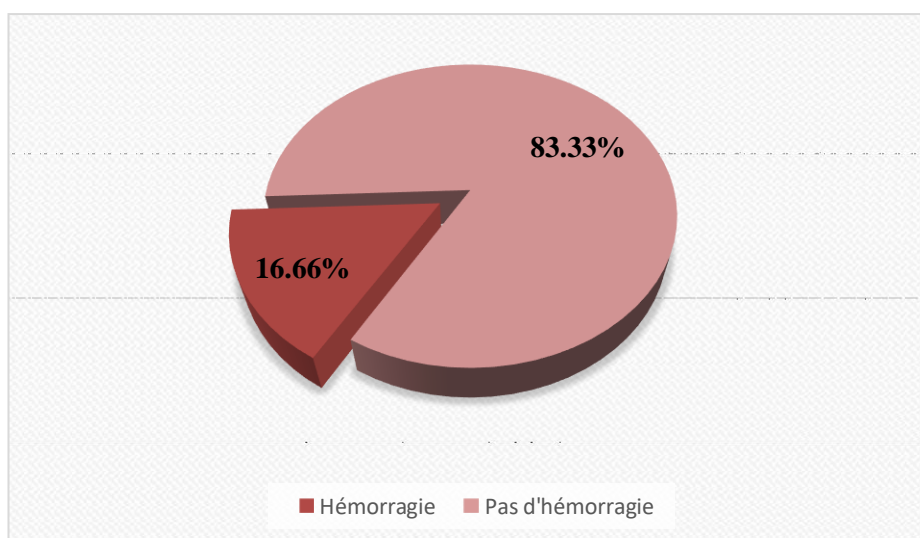
4	E1	Hypémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 01 min 30 sec /	5 7 /	12
	E2	Hypémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 01 min 35 sec /	7 5	12
	E3	Hypémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 00 min 40 sec /	7 5	12
5	E1	Hypémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec 02 min 00 sec /	5 7	12
	E2	Hypémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 01 min 40 sec /	3 7	10
	E3	Hypémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 20 sec /	5 7	12
6	E1	Hypémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec / /	3	3
	E2	Hypémie Coagulation Hémorragie	01 min 00 sec / /	3	3
	E3	Hypémie Coagulation Hémorragie	00 min 47 sec / /	3	3



Les figures 8-9 qui vont suivre montrent la répartition des produits testés selon l'apparition des trois phénomènes étudiés :



**Figure 10 :** Répartition des produits cosmétiques testés par le HET-CAM selon le Phénomène de coagulation



**Figure 11:** Répartition des produits cosmétiques testés par le HET-CAM selon le phénomène d'hémorragie

- En ce qui concerne le phénomène d'hyperémie nous remarquons qu'il est toujours observé, accompagné d'une coagulation seule ou bien d'une coagulation et une hémorragie.

#### Calcul des notations et classification des produits

- Le tableau ci-dessous représente la notation des produits ainsi que leur classification selon le potentiel d'irritation.

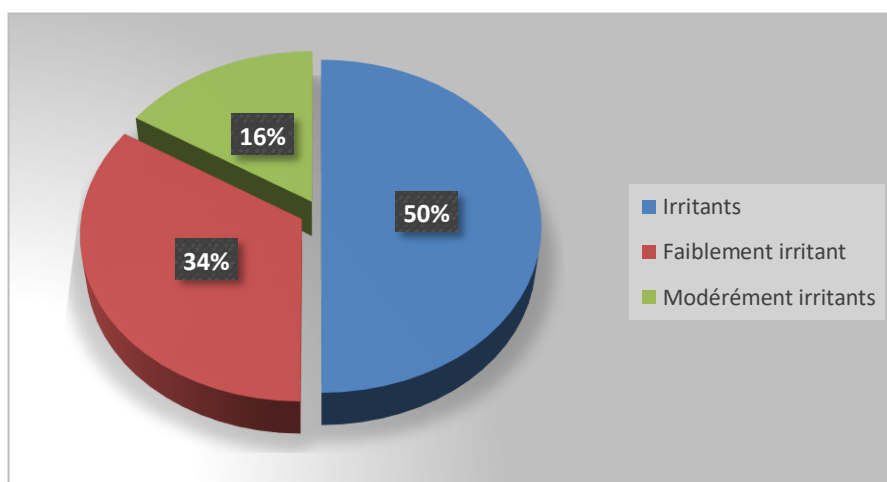
**Tableau VI:** Classification des produits testés selon le potentiel d'irritation.

N°	Notation	Classification
1	18.33	Irritant
2	8.66	Modérément irritant
3	3	Faiblement irritant
4	12	Irritant
5	11.33	Irritant
6	3	Faiblement irritant

Selon les scores obtenus lors du test, on constate que parmi les 6 produits testés il y'a :

- 3 produits irritants.
- 2 produits faiblement irritants.
- 1 produit modérément irritant.
- Aucun produit non irritant.

La figure 10 présente les produits testés selon leur classification :



**Figure 12:** Répartition des produits testés selon le degré d'irritation

- Parmi les 3 produits irritants, 1 produit est un produit d'hygiène corporelle et 2 sont des produits de beauté.
- Le produit d'hygiène corporelle en question est un shampoing.
- Les 2 produits de beauté sont un nettoyant de visage et un gommage.
- Cette étude a démontré que parmi les produits d'hygiène corporelle, seule les après-shampoings sont classés comme faiblement irritants.

- Cette même étude a aussi démontré que parmi les produits de beauté, seules les crèmes de jour sont classées comme faiblement irritants.

### Étude comparative au test de Draize

Le tableau ci-dessous représente une comparaison entre les produits retenus dans notre mise au point, testés par HET-CAM et d'autres résultats de Draize obtenus lors de tests au CHU de Constantine sur ces mêmes produits.

**Tableau VII:** Comparaison entre les produits.

N°	Nature	Résultat HET-CAM	Résultats DRAIZE
1	Shampoing	Irritant	Modérément irritant
2	Nettoyant visage	Modérément irritant	Non irritant
3	Après Shampoing	Faiblement irritant	Non irritant
4	Savon liquide	irritant	Irritant
5	Gommage	irritant	Non irritant
6	Crème de jour	Faiblement irritant	Faiblement irritant

- 2 produits des 6 que nous avons sélectionné et qui ont fait l'objet des tests HET-CAM ont donné une conformité avec le test de DRAIZE sur animaux.
- 4 produits des 6 que nous avons sélectionné et qui ont fait l'objet des tests HET-CAM ont donné des résultats différents par rapport au test de DRAIZE sur animaux.
- 2 produits des 6 que nous avons sélectionné et qui ont fait l'objet des tests HET-CAM sont irritants, alors que ce n'est pas le cas avec le test de DRAIZE sur animaux (résultats négatifs).

Il est admis que l'expérimentation animale devrait être réduite, raffinée ou remplacée dans la mesure du possible. Il existe également une grande variété de modèles *in vitro*, qui sont utilisés comme études de dépistage et d'enquêtes mécanistes. La capacité d'un test *in vitro* à être fiable sur le plan de la recherche est essentielle dans le développement de plusieurs sciences. Ce faisant, les chercheurs prennent en compte les agents chimiques évalués et les stratégies intégrées des tests *in vitro*, il y a un transfert des données toxicologiques et pharmacologique important qui se base sur ce type d'études (Combrisson.,2017).

Les produits chimiques doivent subir de nombreux tests toxicologiques avant d'être enregistrés. L'une de ces expériences est l'examen du potentiel d'irritation oculaire. Pour

connaître l'irritation oculaire, seul le test de Draize *in vivo* est accepté récemment, qui est l'une des méthodes les plus critiquées en raison des blessures infligées aux animaux d'essai.

Plusieurs méthodes *in vitro* ont été utilisées pour étudier la toxicité d'irritants oculaires potentiels en vue de remplacer les tests d'irritation oculaire *in vivo*. Dans le test HET-CAM, des produits chimiques sont placés en contact direct avec la membrane chorioallantoïque de l'œuf de poule. La survenue d'une lésion vasculaire ou d'une coagulation en réponse à un composé est à la base de l'utilisation de cette technique comme indication de la probabilité qu'un produit chimique endommage les muqueuses (en particulier l'œil) *in vivo* (**Steiling et al., 1999**). Dans cette mise au point, un criblage comparatif a été réalisé avec un ensemble de produits pour établir des données parallèles sur les résultats *in vitro* (HET-CAM) et *in vivo* (Draize) dans le cas de 6 produits Cosmétiques.

Le test HET-CAM présente plusieurs avantages, notamment sa rapidité, sa simplicité, sa sensibilité, sa facilité de performance et son bon marché relatif. Les inconvénients du test HET-CAM sont la nature subjective de l'évaluation des résultats. Les résultats de cette méthode sont généralement bien corrélés avec les résultats *in vivo* dans le cas des irritants forts, mais semblent moins corrects lorsque des agents légèrement irritants sont testés (**Deb Basch et al., 2005**). L'évaluation ne peut pas être faite dans le cas de produits chimiques opaques, car ces matériaux recouvrent la membrane. Pour tester les formulations en poudre ou en granulés, la méthode de rinçage du test HET-CAM peut être utilisée, mais elle est plus compliquée que la méthode simple en raison des dommages causés par le rinçage (**Budai et al., 2010**).

Dans plusieurs expériences, une bonne corrélation a été trouvée entre les résultats du test HET-CAM *in vitro* et ceux du test d'irritation oculaire *in vivo* de Draize (**Budai et al. 2010**). Ce test est un test alternatif approprié pour évaluer l'irritation oculaire des substances chimiques ou de formulations (**Vinardell et Mitjans, 2006 ; Lima Sá et Gaspar., 2016 ; Kapoor., 2019**). De même, un autre test utilisant la membrane chorioallantoïque (BECAM, CAM-TBS) est également utile pour la prédiction de l'irritation de la peau et des yeux comme test *in vitro* au lieu d'expérimentations animales (**Gubbels-van Hal et al. 2005; Lagarto et al., 2006**). Depuis 1992, les autorités allemandes ont accepté l'utilisation des données HET-CAM pour la classification des produits chimiques R41 dans la notification de nouveaux produits chimiques industriels (**Balls et al. 1999 ; Barroso et al., 2016**).

Dans les résultats pris pour la réalisation de cette mise au point, une similarité a été observée entre les données des méthodes *in vitro* et *in vivo* (**tableau VII**). Sur la base des résultats, le test HET-CAM a donné la même catégorie d'irritation pour deux produits (Savon liquide et crème de jour). Sur la base de la comparaison des tests *in vitro* et *in vivo*, le test

### ***VIII. Mise au point sur la méthode HET-CAM***

---

HET-CAM a montré un potentiel d'irritation plus fort pour 3 produits (gommage, après Shampoing, nettoyant visage) et un potentiel d'irritation plus sévère pour un produit (Shampoing).

Le test HET-CAM ne pouvait pas remplacer le test toxicologique d'irritation oculaire Draize actuellement utilisé. Des tests *in vitro* plus parfaits ou plus complets doivent être développés pour remplacer l'ensemble du test animal. Le test HET-CAM peut être utile dans le cadre d'une batterie de tests pour réduire l'expérimentation sur les mammifères et pour limiter ou éliminer la douleur et les blessures infligées aux animaux de laboratoire.

## Conclusion

L'oeil est un organe sensitif extrêmement important. Tout produit chimique entrant en contact intentionnellement ou non avec la muqueuse oculaire peut entraîner des troubles allant de la simple gêne à des lésions graves entraînant la perte de la vision. Draize a mis au point une méthode d'évaluation de la tolérance oculaire des produits chimiques sur des lapins qui est devenue la technique de référence pour de nombreuses organisations (OCDE, ONU, UE). Néanmoins, l'utilisation de mammifères pour ces expérimentations pose de nombreux problèmes éthiques.

Le développement de méthodes alternatives est donc un sujet d'importance majeure en toxicologie actuellement et cela d'autant plus qu'à titre d'exemple, l'UE a interdit toute expérimentation sur les mammifères pour l'évaluation des produits cosmétiques depuis juillet 2013. Tout ceci a accéléré le développement d'une politique dite des 3 R (réduction, raffinement, remplacement) dont le but est de réduire les expérimentations sur ces mammifères au strict minimum.

Dans ce scénario, de nombreux criblages ont été effectués par des scientifiques sur diverses catégories de produits chimiques d'essai tels que les produits cosmétiques, de toilette et de parfumerie (**Jones *et al* 2001**). Divers irritants oculaires à large spectre, classes chimiques, structures chimiques, y compris les alcools, les amines, l'acide carboxylique ont également été évalués depuis bien longtemps (**Gettings *et al.* 1991 ; Gilleron *et al.* 1996, 1997**).

Par conséquent, avec l'avènement du test HET-CAM *in vitro*, un travail considérable a été effectué. Cependant, les données sur certaines autres catégories comme les pesticides sont plutôt rares par rapport à d'autres produits et le potentiel d'irritation oculaire des pesticides est régulièrement évalué à l'aide d'un modèle animal entier, faute de techniques *in vitro* validées (**Budai *et al.* 2010**).

Pour finir, nous remarquons une forte augmentation et une tendance continue à la hausse dans le développement et l'adoption d'alternatives *in vitro* à l'expérimentation animale dans le secteur pharmaceutiques et cosmétique, offrant de nouvelles opportunités pour améliorer les taux de réussite, associées à un engagement fort en faveur des 3R. Cependant, malgré la tendance encourageante, il reste encore beaucoup à faire; il y a un besoin pressant d'améliorer les taux de réussite de ces techniques et aussi de rendre l'échec moins coûteux, peut-être via le développement et la validation d'autres tests de laboratoire *in silico* et *in vitro*

qui pourraient résoudre les principales raisons de l'échec: toxicité inattendue et / ou manque d'efficacité.

Référence bibliographique

-A-

**Académie national de pharmacie. Le 29 juin 2017.** Protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Académie des sciences, institue de France.

**Adriaens E, Barroso J, Eskes C, Hoffmann S, Mcnamee P, Alépée N, et al. 2014** Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

**Anderson Diana. 1990.** *In Vitro Models Drug Safety*.5:48.

**Arrêté du 29 novembre 1996.** relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques. *JORF n°300 du 26 décembre 1996 page 19137.*

**Augustin AJ, Spitznas M, Kaviani N, et al. 1995.** Oxidative reactions in the tear fluid of patients suffering from dry eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* ; 233 : 694–698.

-B-

**Balls M, Brantom PG, Cassidy S, Esdaile D, Fentem J, Liebsch M, McPherson J, Pfannenbecker U, Prinsen M. 1999.** Preliminary evaluation of the application of reference standards in the prevalidation and validation of *in vitro* test for eye irritation. In: DG Clark, SG Lisansky and R Macmillan: Alternatives to animal testing II, proceedings, Brussels. *CPL Press, Berkshire; 201-204.*

**Barroso João, Pfannenbecker Uwe, Adriaens Els, Alépée Nathalie, Cluzel Magalie, Smedt Ann, Hibatallah Jalila, Klaric Martina, Mewes Karsten, Millet Marion, Templier Marie, Mcnamee Pauline. 2016.** Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Archives of Toxicology.* 91.

**Barry D. Kels, MD, JDa , Andrzej Grzybowski, MD, PhD, MBAb,c, Jane M. Grant-Kels, MDd. 2015 .** Human ocular anatomy . *Clinics in Dermatology* 33, 140–146

**Batellier L, Poilane C, Rault J, Chaumeil C, Scat Y. 1999.** Measurement of total IgE in tears: the adaptation of an immunoenzyme technique and the value of investigating locally produced IgE in the diagnosis of chronic conjunctivitis. *Ann Biol Clin (Paris)* ; 57 : 469-473.

**Baudouin C, Bourcier T, Brignole-Baudouin F, et al. 2000.** Correlation between tear IgE levels and HLA DR expression by conjunctival cells in allergic and nonallergic chronic conjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* ; 238 : 900–904.

**Bensakhria A. 2018.** Facteurs influençant la toxicité d'une substance ; chapitre 6

**Boughedda Oualid, Bendjaber Moussa.2015.** Place des tests in vitro en toxicologie. *Mémoire master.*

**Budai P, Lehel J, Tavaszi J, Kormos E. 2010.** HET-CAM test for determining the possible eye irritancy of



pesticides. *Acta Vet Hung.*; 58(3):369-377.

**Budai Péter & al. 2010.** HET-CAM test for determining the possible eye irritancy of pesticides. *Acta Veterinaria Hungarica* 58 (3), pp. 369–377.

**-C-**

**CSST. 2005.** Notion de toxicologie.

**-D-**

**Debbasch C, Ebenhahn C, Dami N, Pericoi M, Van den Berghe C, Cottin M, and Nohynek G J. 2005.** Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product compositions. *Fd. Chem. Toxic.* 43, 155–165.

**-E-**

**Ekwall, B. 1983.** Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 407(1 Cellular Syst), 64–77. doi:10.1111/j.1749- 6632.1983.tb47814.x

**-F-**

**FRANK C. 1991.** Toxicologie : donnée générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Masson.

**-G-**

**Gettings S, Teal J, Bagley D, Demetrulias J, DiPasquale L, Hintze K, Rozen MG, Weise SL, Chudkowski M, Marenus KD, Pape WJW, Roddy MT, Schenetzinger R, Silber PM, Glaza SM, Kurtz. 1991.** Evaluation of alternatives program: An evaluation of in vitro alternatives to the Draize primary eye irritation test. Phase 1: Hydro-alcoholic formulations. Part 2: Data analysis and biological significance. *In Vitro Toxicol.* 4247288.

**Gilleron L, Coecke S, Sysmans M, Hansen E, Van oproy S, Marzin D, Van Cauteren H, Vanparys P 1996.** Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy. *Toxicol.* 10431446

**Gilleron L, Coecke S, Sysmans M, Hansen E, Van oproy S, Marzin D, Van Cauteren H, Vanparys P. 1997.** Evaluation of the HET-CAM-TSA method as an alternative to the Draize eye irritation test *Toxicol.* 11641644.

**Gubbels-Hal, W.M.L.G. & Blaauboer, B.J. & Barentsen, Helma & Hoitink, M.A. & Meerts, Ilonka & Hoeven, J.C.M.. 2005.** An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. *Regulatory toxicology and pharmacology* 42(3):284-95.

**-H-**

**Harry G J, Billingsley M, Bruinink A, Campbell I L, Classen W, Dorman, D C, ... Tilson H A. 1998.** In

vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, 106(suppl 1), 131–158.

**Hélele Combrisson.2017.** Animal experiment, can we replace?. *Transfusion Clinique et biologique*. 24(3), 93-95

**-I-**

**INERIS. 12 mai 2011.** Méthodes alternatives en expérimentation animale : Cas concrets d'outils d'évaluation in vitro / in vivo et de méthodes de prédiction in silico.

**-J-**

**Jones PA, Budynsky E, Cooper KJ, Decker D, Griffiths HA, Fentem JH. 2001.** Comparative evaluation of five in vitro tests for assessing the eye irritation potential of hair-care products. *Altern Lab Anim*; 29(6):669-692.

**-K-**

**Kapoor, Ankita. 2019.** Het cam irritancy study for development of gatifloxacin in situ gel formulation. *International Journal of Advanced Research*. 7. 1218-1225.

**Kobetsa Tetyana et al. 13 march 2018.** In ovo testing of flavor and fragrance materials in Turkey Egg Genotoxicity Assay (TEGA), *comparison of results to in vitro and in vivo data*. 115:228-243.

**-L-**

**La règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer 20 June 2020.** | Inserm - La science pour la santé. Retrieved, from : <https://www.inserm.fr/professionnels-recherche/recherche-pre-clinique/experimentation-animale/regle-3-r-reduire-raffiner-remplacer>.

**Lagarto Parra, Alicia & Vega Montalvo, Raiza & Guerra, I & González, R. 2006.** In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 20(5):699-702.

**Le page n. 2014.** Évaluation de la tolérance oculaire de trois shampoings physiologique canins a l'aide du modele « Slug Mucosal Irritation » (SMI). *École nationale vétérinaire d'alfort*, p.34.

**Lechat, Philippe. 2005.***Cours Pharmacologie*. Paris.

**Lemiere Sébastien. 2004.** Intérêts du test des comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale. *Toxicologie. Université Paul Verlaine – Metz*.

**Leonardi A, Borghesan F, Faggian D, Depaoli M, Secchi AG, Plebani M. 2000.** Tear and serum soluble leukocyte activation markers in conjunctival allergic diseases. *Am J Ophthalmol* ; 129 : 151-158.

**Leonardi A, Curnow Sj, Zhan H, Calder VI. 2006.** Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal

and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy* ; 36 : 777-784.

**Lima Sá, Larissa & Gaspar, Lorena. 2016.** HET-CAM: an alternative method for assessing ocular irritation of cosmetic ingredients. *Conference: 7th Internacional Symposium of Graduate and Research.*

**Luepke N. P. 1985.** hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fdchem. Toxk.* Vol. 23, N° 2. pp. 287-291.

**Luepke N. P. and Kemper F. H. 1986.** The HET-CAM test : An alternative to the draize eye test. *Fd Chem. Toxic.* Vol. 24, N° 6/7, pp. 495-496.

**-M-**

**Maurer J K, & Parker R D. 2000.** *Microscopic Changes with Acetic Acid and Sodium Hydroxide in the Rabbit Low-Volume Eye Test. Toxicologic Pathology, 28(5), 679–687.*

**Md. Anisur Rahman. 2013.** An introduction to morphology of the reproductive system and anatomy of hen's egg. Department of Zoology, University of Rajshahi, Rajshahi-6205, Bangladesh. *J. Life Earth Sci.,* Vol. 8: 1-10.

**Mennier E. 13 juin 2020.** Pharmacocinétique. Récupéré, à partir de : <https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/36-etapes-du-devenir-du-medicament/72-biotransformations>

**Merle H, Gérard M, Schrage N. 2008.** *Brûlures oculaires. Journal Français d'Ophthalmologie, 31(7), 723–734.* doi:10.1016/s0181-5512(08)74391-2

**Michael Balls. 1 juillet 1994.** *In research, education and testing* ; pp. 193–211.

**Michael F. W. Festing. Jul 1, 1994.** Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments; pp. 212–221

**-N-**

**Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. 1998.** Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res;* 17: 673–676.

**-O-**

**OCDE. N° 405. 2002.** guidelines for the testing of chemicals. Guideline. Acute eye irritation/corrosion. OCDE, Paris.

**OCDE. N° 439 .2013.** Test Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué.

**OCDE. N° LD 487.2014.** Test du micronoyau in vitro sur cellules de mammifères,

**OCDE. N°405. 2012.** Acute Eye Irritation/Corrosion.

**OCDE. N°432. 2004.** Essai de phototoxicité in vitro, 3T3 Neutral Red Uptake.

**OCDE. N°438.2013.** Test sur œil de poulet isolé (opi).

**OCDE. N°473. 2014.** Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères.

**OCDE. N°476.1997.** Test de mutation génique sur cellules de mammifère.

**OCDE. N°479. 1986.** Essai in vitro d'Échange de Chromatides-sœurs sur Cellules de Mammifère ".

**OCDE. N° 471. 1997.** Test de mutation reverse sur bactéries.

**OCDE. N°482. 1986.** Synthèse Non Programmée de l'ADN (UDS) sur Cellules de Mammifère «in vitro ».

**-P-**

**P. A. Flecknell. First Published Jul 1, 1994.** Refinement of animal use-assessment and alleviation of pain and distress. *Lab Anim.* 28(3):222-231.

**-R-**

**Rapp A, Hausmann M and Greulich KO 2005.** The comet-FISH technique: a tool for detection of specific DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 291:107-119.

**-S-**

**Shoji J, Inada N, Sawa M. 2006.** Antibody array-generated cytokine profiles of tears of patients with vernal keratoconjunctivitis or giant papillary conjunctivitis. *Jpn J Ophthalmol*; 50 : 195-204.

**Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. 2001.** Pro- and anti- inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* ; 42 : 2283–2292.

**Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, de Silva O.** The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. *Toxicol In Vitro.* 1999;13(2):375-384.

**-T-**

**Tabbara KF. 2001.** Tear tryptase in vernal keratoconjunctivitis. *Arch Ophthalmol*; 119 : 338-342.

**Teshager Dubie, Tesfaye Sisay Tessema et al. 2014 .** The potential application of avian egg antibodies with emphasis on immunotherapeutic and immunodiagnostic purpose. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*

**-V-**

**Venza I, Visalli M, Ceci G, Teti D. 2004.** Quantitative determination of histamine in tears during conjunctivitis by a novel HPLC method. *Ophthalmic Res*; 36 : 62-69.

**Vinardell MP, Mitjans M. 2016.** The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvents. *Toxicology in Vitro: an International Journal*

*Published in Association with BIBRA. 20(6):1066-1070.*

**Virtanen T, Konttinen YT, Honkanen N, et al. 1997.** Tear fluid plasmin activity of dry eye patients with Sjögren's syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* ; 75 : 137–141.

## Résumé

De nos jours, il est impératif que les produits chimiques et préparations subissent des tests toxicologiques pour évaluer leur potentiel à provoquer une irritation oculaire, par ex. pour la sécurité au travail, ou avant leur commercialisation. L'irritation oculaire a traditionnellement été examinée en utilisant le test d'irritation oculaire chez le lapin et ses variantes, et est évaluée conformément à la ligne directrice 405 de l'OCDE. Ces résultats sont nécessaires pour la classification chimique selon le système de l'Union européenne (UE) et le Système général harmonisé. Pour des raisons éthiques et économiques, et également en raison des contraintes imposées par les nouvelles lois sur la protection des animaux, des méthodes alternatives puissantes doivent être développées, pour réduire, affiner et remplacer les expériences sur les animaux. Plusieurs méthodes in vitro ont été proposées comme alternatives au test oculaire chez le lapin, qui comprennent des systèmes de culture cellulaire et l'utilisation de tissus reconstruits, parmi ces techniques nous trouvons le test HET-CAM.

Le test HET-CAM a été largement validé au niveau inter-laboratoires. Cette méthode est connue pour être d'une sensibilité, d'une reproductibilité, d'une simplicité et d'une économie appropriée pour une utilisation courante. Dans ce mémoire, nous avons choisi de faire un aperçu sur les techniques in vitro les plus utilisés, des progrès récents dans les alternatives au test d'irritation oculaire de Draize, avec la mise en lumière du test de la membrane chorioallantoïque (HET-CAM).

**Mots clés :** HET-CAM, Draize, Inflammation oculaire, Tests alternatives, In Vitro

## Abstract

Nowadays, it is imperative that chemicals and preparations generally undergo toxicological testing to assess their potential to cause eye irritation, eg, for safety at work, or before they are marketed. Eye irritation has traditionally been examined using the rabbit eye irritation test and its variants, and is assessed in accordance with OECD Guideline 405. These results are required for chemical classification according to the European Union (EU) system and the Globally Harmonized System. For ethical and economic reasons, and because of the constraints imposed by new animal welfare laws, powerful alternative methods must be developed, to reduce, refine and replace animal experiments. Several in vitro methods have been proposed as alternatives to the eye test in rabbits, which include cell culture systems and the use of reconstructed tissues, among these techniques we find the HET-CAM test.

The HET-CAM test has been widely validated at the inter-laboratory level. This method is known to be of sensitivity, reproducibility, simplicity and economy suitable for current use. In this dissertation, we have chosen to provide an overview on the most used in vitro techniques, recent progress in alternatives to the Draize eye irritation test, with the highlighting of the chorioallantoic membrane test (HET-CAM).

**Key words:** HET-CAM, Draize, Eye inflammation, Alternative tests, In Vitro

## ملخص:

في وقتنا الحالي أصبح من الضروري أن تخضع المواد الكيميائية و التحضيرات لاختبارات السمية لتقييم إمكانيتها في التسبب في تهيج العين مثال. من أجل السلامة في العمل أو قبل التسويق. تقليديا كان يبحث في تهيج العين باستعمال اختبار تهيج العين عند الأرنب و مختلف أنواعه و تطورت وفقا للمبدأ التوجيهي رقم 405 لمنظمة التعاون الاقتصادي والتنمية. هذه النتائج ضرورية من أجل التصنيف الكيميائي حسب نظام الاتحاد الأوروبي و النظام المنسق عالميا. من أجل أسباب أخلاقية و اقتصادية، وكذلك بسبب القيود التي تفرضها القوانين الجديدة على حماية الحيوانات يجب تطوير طرق بديلة قوية، لتقليل و صقل و استبدال التجارب على الحيوانات. تم اقتراح عدة طرق في المختبر كبديل لاختبار العين على الأرانب والتي تشمل أنظمة زراعة الخلايا و استخدام الأنسجة المعاد بنائها و من بين هذه التقنيات نجد اختبار هات كام. تم التحقق من صحة اختبار هات كام على نطاق واسع على المستوى المشترك بين المختبرات. من المعروف أن هذه الطريقة تتسم بالحساسية، القابلية للتكرار اخترنا تقديم نظرة عامة على التقنيات الأكثر استخدامًا م البساطة و التكلفة المنخفضة المناسبة للاستعمال الدائم. في هذه الرسالة، ا في المختبر، و آخر التطورات في بدائل اختبار درايز لتهيج العين مع تسليط الضوء على اختبار هات كام

الكلمات المفتاحية : درايز، هات كام، التهاب العين، الاختبارات البديلة، ان فيترو