



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Animal

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie et Santé

Intitulé :

Place des tests in vitro en toxicologie

Présenté et soutenu par : **BOUGHEDDA oualid**

Le : **17 / 06 / 2015**

BENDJABER moussa

Jury d'évaluation :

Président du jury : LALAOUL.K Professeur à l'Université Mentouri Constantine

Rapporteur : BELMAHI.M.H Chef de service toxicologie CHU Constantine

Examineurs : AMEDAH.S Professeur à l'Université Mentouri Constantine

ZAMA.DJ Professeur à l'Université Mentouri Constantine

MENAD.A Professeur à l'Université Mentouri Constantine

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciements

On exprime tout d'abord, nos profonds remerciements et louanges à dieu tout puissant, qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Arrivés au terme de la rédaction de ce mémoire, il nous est particulièrement agréable d'exprimer notre gratitude et nos remerciements au Pr BELMAHI Mohamed Habib, toxicologue, chef de service de toxicologie au CHU de Constantine qui a dirigé ce travail et qui est pour nous un model de compétence et de professionnalisme à suivre.

Nos remerciements les plus sincères vont au Pr.

LAAIAOUI.K pour sa disponibilité incessante, ses conseils rigoureux et pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ce mémoire.

Nos remerciements sincères vont à Mme AMEDAH.S, qui nous a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

Nos remerciements vont également à Mme ZAAMA, pour accepté d'examiner ce mémoire et d'être membre de jury.

*Nos remerciements aussi à Pr.MENAD.A pour accepté d'être
membre de jury.*

*On tient à témoigner notre reconnaissance, et notre gratitude à
Dr BOUCHALA.F, d'abord pour sa gentillesse, pour nous
avoir aidé à réaliser le test du HET-CAM et pour ses
multiples relectures et ses précieuses corrections.*

*Un grand Merci à tous nos enseignants qui ont contribué à
notre formation.*

*On remercie nos collègues et nos amis pour les sympâtiques
moments que nous avons passés ensemble.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont
également à l'encontre de toutes les personnes qui ont
contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail.*

Oualid et moussa

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents qu'ils trouvent ici
témoignage de ma profonde gratitude pour leur
amour leur encouragement et leur soutien tout au long
de mes études que DIEU bénisse.*

*A ma sœur ablem et mes deux frères daouad et
housssem.*

*A celui qui a su transformer mes angoisses et
interrogation en assurance, courage et espoir, celui
qui a toujours été là pour moi à mon très cher ami
abdeldjabar.*

*A mon très cher ami et mon binôme moussa qui m'a
toujours soutenu par son sourire.*

A decorative border of arrows, each with a dotted tail and a solid arrowhead, arranged in a rectangular frame around the text.

A toutes mes amies que j'aime.

A tous mes collègues de la pharmacie.

A tous ceux que j'aime.

*A tout le personnel administratif et technique de la
faculté des sciences de la nature et de la vie de
l'université de Constantine.*

*Très sincèrement et du profond du cœur je vous
dédie mon mémoire et j'espère vous avoir honoré.*

OUALID

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents qu'ils trouvent ici
témoin de ma profonde gratitude pour leur
amour leur encouragement et leur soutien tout au long
de mes études que DIEU bénisse.*

*A tout ma petite famille foudia, farab, sata, nassin,
didou et sa nouveau née djibane.*

*A Dr BOUCHALA.F mes Salutations pour elle
pour sa gentillesse.*

*A mon très cher ami et mon binôme oualid qui ma
toujours soutenu par son sourire.*

A toutes mes amies que j'aime.

A tous mes collègues de la piscine.

A decorative border of arrows, each with a dotted tail and a solid black arrowhead, pointing outwards from the center of the page. The arrows are arranged in a rectangular frame.

A tous ceux que j'aime.

*A tout le personnel administratif et technique de la
faculté des sciences de la nature et de la vie de
l'université de Constantine.*

*Très sincèrement et du profond du cœur je vous
dédie mon mémoire et j'espère vous avoir honoré.*

MOUSSA

SOMMAIRE

Introduction	
Partie I: partie théorique	
CHAPITRE I: La toxicité et la relation dose effet en toxicologie	1
I -Notions de toxicologie	1
A- Définition de la toxicité	1
B- Définition de la toxicité aiguë	1
C- Définition de la toxicité chronique	1
II -Notion d'exposition et d'effet	2
A - Définition de la dose toxique.....	2
B- Définition de l'effet toxique	2
C- Relation dose effet	2
III- Les facteurs d'influence	4
A- la toxicité	4
B- La biotransformation	4
C - l'individu	4
C.1- Bagage génétique	4
C.2- Les Facteurs physiologiques.....	4
a. L'Âge.....	4
b. Le sexe	4
c. L'état de santé	5
d. La grossesse	5
C.3- Les Facteurs extrinsèques	5
a. L'État nutritionnel	5
b. L'environnement	5
D- Hyper susceptibilité	5
E- Les Interactions	5
CHAPITRE II: Expérimentation animale	6
I - L'intérêt de l'expérimentation animale	6
A - recherche fondamentale	6
B - risque lié à l'exposition aux agents toxiques	7
C - recherche pédagogique	7
II- Méthodes d'évaluation de la toxicité in vivo	8
A- Études de toxicologie générale	8
A .1-Études de toxicité aiguë par voie systémique	8
a. Dose minimale mortelle (DMM)	8
b. Dose létale 50 (DL50)	8
c. Toxicité aiguë par inhalation (CL 50)	9
A .2-Étude de toxicité aiguë par voie locale	9
a. Test D'irritation / corrosion cutanée (OCDE n° 402)	9
b. Test d'irritation/ corrosion oculaire (OCDE n° 405)	9
c. Études de toxicité chronique (OCDE n° 452)	10

B- Eudes de toxicologie spécifique	10
B.1- Études de reprotoxicité	10
B.2- La mutagénicité (effet mutagène)	10
a. Test d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifère	10
b. Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifère (OCDE n° 474)	10
B.3- Étude de la cancérogenèse (OCDE n° 451)	11
III-Avantages et inconvénients des tests in vivo	11
A. Avantages	11
B. Inconvénients	11
CHAPITRE III : les méthodes alternatives	12
I- La place des méthodes alternatives	12
A- La règle des 3 R	12
A.1- Réduire	13
a. Utiliser moins d'animaux en expérimentation	13
b. Rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation	13
A. 2- Raffiner	14
a. Raffiner avant l'expérimentation	14
b. Raffiner pendant l'expérimentation	14
c. Raffiner après l'expérimentation	15
A. 3- Remplacer	15
II- Méthodes d'évaluation de la toxicité in vitro	15
A- Les alternatives aux tests d'irritabilité	15
A.1- Test d'Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué (OCDE n°439) .	15
A.2- Test de fixation du rouge neutre : Test de phototoxicité (OCDE n° 432) ...	16
A.3- Tests d'Eyetex	16
A.4- Test de HET-CAM	16
A.5- Test sur œil de poulet isolé (opi) (OCDE n° 438).....	17
B- Tests de mutagenèse	17
B .1- Test d' Ames mutation reverse sur bactéries (OCDE n° 471)	17
B .2-Test de mutation génique sur cellules de mammifère (OCDE n° 476)	18
B .3- Test de synthèse non programmé de l'ADN (OCDE n° 482)	18
B .4- Test d'échange de chromatides –sœurs	18
B .5- Test d'aberration chromosomique in vitro sur cellules de mammifère	19
B .6-Test de micronoyaux in vitro sur cellules de mammifère (OCDE n° LD 487).	19
B .7-Test des comètes	20
III- Avantages et limites des méthodes in vitro	21
A- Les Avantages	21
B - Les Limites	22
Partie II : partie pratique	
Objectifs pratique	23
CHAPITRE I : Revue bibliographique du HET-CAM test	24
INTRODUCTION	24
I- HET-CAM test: Hen's egg test chorio-allantoic membrane	24

A-Propriétés de la membrane chorio-allantoïdienne	24
B-Historique du test	25
CHAPITRE II: Essai proprement dit	27
I. Objectif et principe	27
II. Echantillonnage	27
III. Matériels et méthodes	29
A. Matériels	29
A.1-Réactifs	29
A.2- Instrumentation	29
B. Méthodes : méthode alternative au Draize oculaire (HET-CAM test)	29
IV. Résultats	34
A. Présentation des scores obtenus	34
B. Calcul des notations et classification des produits	40
C. Etude comparative au test de Draize	43
V. DISCUSSION	46
CONCLUSION	48
ANNEXES	

Liste d'abréviations

3 H-TdR:	Thymidine tritiée
3 R:	Reduce. Refine. Replace
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AG :	L'aza-8 guanine
ATCC :	American Type Culture Collection
BrdU :	Bromodésoxyuridine
CCPA :	Conseil canadien de protection des animaux
CCVAM :	Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternative
CE50 :	Concentration-effet
CL 50 :	Concentration létale 50
CO2 :	Dioxyde de carbone
CSB :	Coupures simple brin
CytoB :	Agent de blocage de la cytokine II
DL50 :	Dose létale 50
DMBA :	Diméthylbenzanthracène
DMM :	Dose minimale mortelle
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DO:	Densité optique
Dpm/g:	Disintegrations Per Minute Per Gram
EBSS:	Earl's Balanced Salt Solution
ECACC:	European Collection of Cell Cultures
ECVAM :	Centre européen pour la validation de méthodes alternatives
HET-CAM:	Hen's egg test chorio-allantoic membrane
HPRT :	L'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
I.I.O :	Indice d'irritation oculaire
INERIS :	Institut national de l'environnement industriel et des risques
Irr :	Irradiante spectral
JaCVAM :	Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives
LSC :	Scintillation liquide
MCA :	Membrane chorio-allantoïdienne
NR :	Neutral Red
OCDE :	Organisation de coopération et de développement économiques
ONU:	Organisation des nations unies
OPI:	Œil de poulet isolé
p/p:	Poids/poids
PBS:	Phosphate buffered saline
PHA:	Phytohémaglutinine
REACH :	Enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques

SCE :	D'échange des chromatides-sœurs
SCHER :	Scientific Committee on Health and Environmental Risk
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
SGH :	Système général harmonisé
TFT:	Trifluorothymidine
TG:	Thio-6 guanine
TK:	Thymidine kinase
TN:	Témoin négatif
TP:	Témoin positifs
UDS :	Synthèse non programmée d'ADN
UVA :	Ultraviolet classe A
UVB :	Ultraviolet classe B
v/v:	Volume/volume
XPRT :	Xanthine-guanine phosphoribosyl transférase

Liste des tableaux

Tableau 1 : Formes d'intoxication.....	1
Tableau 2 : Comparaison entre l'exposition aiguë ou chronique et l'effet aiguë ou chronique.....	2
Tableau 3 : Liste des produits cosmétiques utilisés.....	27
Tableau 4 : Critères d'évaluation du HET-CAM.....	32
Tableau 5 : Notation en fonction du temps.....	33
Tableau 6 : Expression des résultats selon la notation.....	33
Tableau 7 : Présentation des scores selon le degré d'irritation.....	34
Tableau 8 : Classification des produits testés selon le potentiel d'irritation.....	40
Tableau 9 : Classification des produits testés dans le test HET-CAM et le test de Draize.....	43

Liste des figures

Figure 1 : Relation entre la dose et l'effet.....	3
Figure 2 : Relation entre la dose et la réponse.....	3
Figure 3 : Epiderme humain reconstitué (in vitro).....	16
Figure4 : Phénomènes observées dans le test HET-CAM	17
Figure 5 : présentation du micronoyau sur les cellules de mammifère.....	20
Figure6 : Test des comètes.....	21
Figure 7 : Présentation de la membrane CAM.....	25
Figure 8 : Répartition des produits testés selon leur utilisation.....	28
Figure 9 : Répartition des produits utilisés selon la nature.....	28
Figure 10 : Indication de la chambre à air.....	30
Figure 11 : préparation de la CAM.....	31
Figure 12 : Répartition des produits cosmétiques testés par le HET-CAM selon le phénomène de coagulation.....	39
Figure 13 : Répartition des produits cosmétiques testés par le HET-CAM selon le phénomène d'hémorragie.....	40
Figure 14 : Répartition des produits testés selon le degré d'irritation.....	41
Figure 15 : Répartition des produits irritants selon leur utilisation.....	41
Figure 16 : Répartition des produits d'hygiène corporelle irritants selon leur nature.....	42
Figure 17 : Répartition des produits de beauté irritants selon leur nature.....	42
Figure 18 : Répartition des produits testés avec une conformité au test de Draize.....	44
Figure 19 : Répartition des produits testés avec contradiction au test de Draize.....	44
Figure 20 : Répartition des produits testés avec des résultats différents au test de Draize.....	45

PARTIE THEORIQUE

Introduction

La recherche fondamentale développe et utilise les outils alternatifs pour la compréhension du fonctionnement de base des cellules en biologie cellulaire et moléculaire ainsi qu'en complément de l'expérimentation animale pour l'étude des mécanismes biologiques intègres.

L'expérimentation animale reste également un outil important de la recherche médicale moderne sur de nombreuses pathologies et Pour la production et le contrôle de la qualité des produits de santé animale et humaine et pour les denrées alimentaires.

L'utilisation de « modèle animal » fait partie des outils expérimentaux de l'investigation du vivant avec l'étude expérimentale chez l'Homme, les études sur les tissus, cellules et les molécules biologiques isolées. Elle se situe aussi aux cotes des approches observationnelles (clinique, épidémiologie) chez l'Homme ou l'animal. Aujourd'hui, elle se place de plus en regard des méthodes de modélisation mathématique du vivant.

Le recours à des méthodes alternatives en expérimentation animale est aujourd'hui une nécessité, en égard notamment aux exigences du règlement REACh qui requiert des résultats rapides et fiables sur les propriétés toxiques et écotoxiques des substances chimiques. De plus elles sont nécessaires pour répondre aux préoccupations sociétales autour d'une démarche.

Ceci nous a conduit à réaliser ce travail afin de définir la place des tests in vitro en toxicologie et d'énumérer les différentes méthodes réalisables pour arriver a un meilleur résultat, ainsi que de situer leur limite en pratique toxicologique.

CHAPITRE I :

La toxicité et la relation dose effet en toxicologie

Chaque année, l'industrie met des centaines de nouveaux produits sur le marché, venant ainsi accroître le nombre de ceux qu'on peut déjà utiliser. Il est important de connaître l'innocuité (qualité de ce qui n'est pas nuisible) ou la nocivité (caractère de ce qui est nuisible) des produits chimiques pour bien en saisir les effets sur notre santé.

Il y'a nécessité d'une certaine connaissance des notions et principes propres à la toxicologie, que nous présenterons dans les prochaines sections. [1]

I. Notions de toxicologie :

I. A- Définition de la toxicité:

La toxicité englobe l'ensemble des effets néfastes d'un toxique sur un organisme vivant. Autrement dit, il s'agit de la capacité inhérente à une substance chimique de produire des effets nocifs chez un organisme vivant et qui en font une substance dangereuse.

L'effet néfaste est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type et à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion. [1]

I. B- Définition de la toxicité aiguë:

La toxicité aiguë est la toxicité induite à la suite d'une exposition à une seule dose ou à une exposition d'un toxique sur une courte période de temps. [1]

I. C- Définition de la toxicité chronique:

La toxicité chronique est la toxicité induite à la suite d'expositions répétées d'un toxique sur une période de temps plus longue. [1]

Tableau 1: formes d'intoxication [1]

Forme d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée de l'exposition (Rongeurs)
Aiguë	Unique	< 24 heures
Répétée à court terme	Répétée	= 1 mois
Sub chronique	Répétée	De 1 à 3 mois
Chronique	Répétée	> 3 mois

On parle souvent d'intoxication subaiguë, pour une exposition répétée à court terme, mais ce terme est considéré comme sémantiquement incorrect. [2]

II. Notion d'exposition et d'effet :

II. A - Définition de la dose toxique:

La dose est la quantité d'une substance à laquelle un organisme est exposé. Des doses croissantes résultent généralement en une augmentation de l'intensité et de la diversité des effets toxiques. [1]

II.B- Définition de l'effet toxique:

Lorsqu'un individu absorbe des produits chimiques, divers effets biologiques peuvent se produire et se révéler bénéfiques (ex. : l'amélioration de la santé après l'administration d'un médicament) ou néfastes (ex. : une atteinte pulmonaire suivant l'inhalation d'un gaz corrosif).

L'effet toxique est le résultat d'un processus souvent complexe et il peut entraîner une série de réactions physiologiques et métaboliques. [1]

Tableau 2 : Comparaison entre l'exposition aiguë ou chronique et l'effet aiguë ou chronique [1]

		effet	
		AIGUË	CHRONIQUE
E X P O S I T I O N	AIGUË	Effet à court terme à la suite d'une exposition à court terme (ex. : irritation cutanée causée par le contact avec une solution très diluée d'acide sulfurique)	Effet à long terme à la suite d'une exposition à court terme (ex. : trouble respiratoire persistant à la suite d'une courte inhalation d'une forte concentration de chlore)
	CHRONIQUE	court terme à la suite d'une exposition à long terme (ex. : sensibilisation cutanée à l'éthylène diamine à la suite d'un contact pendant plusieurs années)	long terme à la suite d'une exposition à long terme (ex. : cancer du foie, du poumon, du cerveau et du système hématopoïétique causé par l'exposition à des doses élevées de chlorure de vinyle pendant plusieurs années)

II. C- Relation dose effet:

Un principe important en toxicologie veut que toutes les substances chimiques soient toxiques, car il existe toujours une dose pouvant causer un effet nocif. C'est la notion de seuil toxique, qui représente la quantité minimale sous laquelle il ne se produit pas d'effet. Au-dessus de ce seuil, l'effet observé dépend de la dose (figure 1). Ce seuil s'explique par le fait que le corps humain est constitué d'un grand nombre de cellules, de tissus et d'organes ayant une sensibilité variable et qu'il possède des mécanismes de défense ou d'adaptation. La connaissance du seuil toxique est importante, car elle peut servir à fixer des normes. [1]

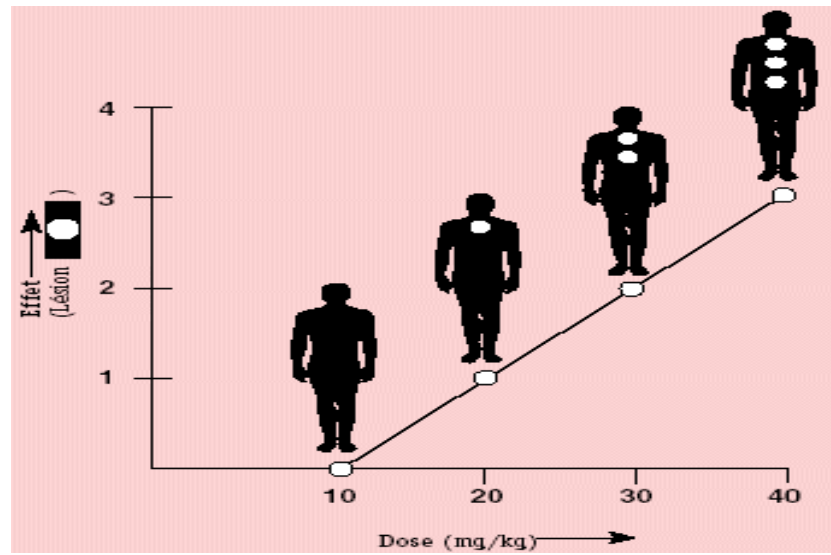


Figure 1 : Relation entre la dose et l'effet [1]

Le même principe s'applique à une population d'individus, car l'effet ou les nombreux effets possibles peuvent se manifester différemment chez plusieurs personnes exposées à une même dose d'un toxique. C'est ce qu'on appelle la relation dose-réponse ou exposition-réponse, soit la relation entre l'exposition et le nombre d'individus qui présentent un effet donné. La figure 2 illustre bien qu'à certaines doses toutes les personnes ne sont pas atteintes. [1]

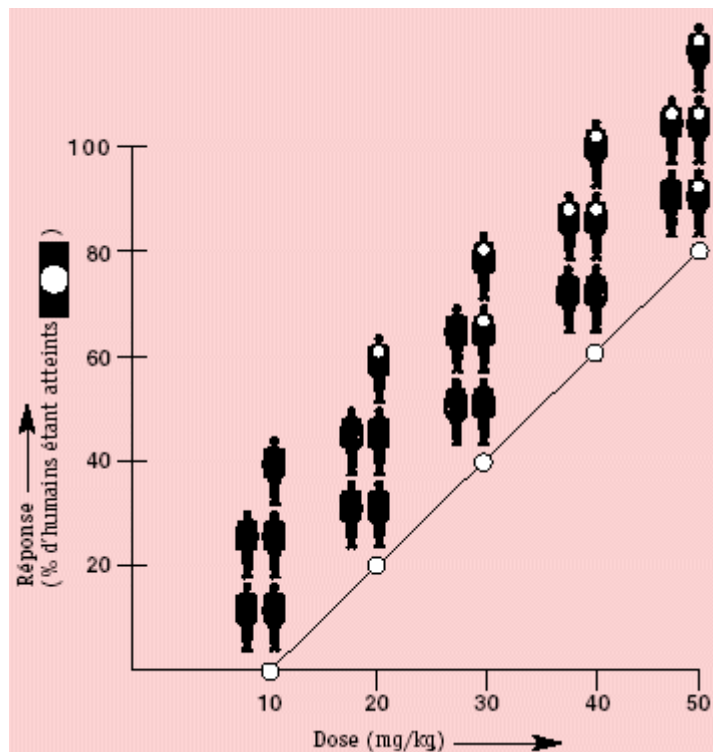


Figure 2 : relation entre la dose et la réponse [1]

Ainsi:

- ✓ une augmentation de la dose peut entraîner une augmentation des effets chez un individu.
- ✓ La proportion des individus affectés par une dose donnée devrait augmenter avec l'accroissement de la dose. [1]

III. Les facteurs d'influence :

III. A- la toxicité:

Les toxiques ne présentent pas tous le même degré de toxicité. Certains ont une faible toxicité, même si on les absorbe en grande quantité, par exemple le sel de table, tandis que d'autres ont une forte toxicité, même si on en absorbe de faibles quantités, notamment les dioxines. On peut en partie expliquer de telles variations 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. [1]

III.B- La biotransformation:

Les biotransformations des xénobiotiques jouent souvent un rôle clé dans la détermination du type et de la gravité des effets obtenus. Très souvent, ces biotransformations, en éliminant la substance mère à laquelle un organisme est exposé, vont contribuer à annuler ou à faire disparaître l'effet, dans la mesure où c'est la substance initiale qui est effectivement à l'origine de la toxicité. [2]

III.C - l'individu:

La population humaine est un groupe hétérogène au sein duquel il existe une grande variabilité entre les individus. Ceux-ci peuvent être affectés différemment par une même dose toxique, et une personne peut y réagir différemment selon le moment (relation dose-réponse).

Deux principales catégories de facteurs contribuent à expliquer la nature et l'intensité des effets toxiques. [1]

III.C.1- Bagage génétique:

Des différences génétiques peuvent intervenir dans la capacité des individus à transformer des toxiques.

Certains nombres d'enzymes interviennent dans cette transformation comme les cytochromes avec des mécanismes différents. [1]

III.C.2- Les Facteurs physiologiques:

a. L'Âge:

La sensibilité aux effets toxiques est habituellement plus grande chez les enfants et les personnes âgées. [1]

b. Le sexe :

Il existe des différences entre les hommes et les femmes, notamment en ce qui concerne la toxicocinétique des toxiques.[1]

c. L'état de santé:

Les individus en bonne santé sont plus résistants, car ils métabolisent et éliminent les toxiques plus facilement que ceux qui souffrent de maladies hépatiques ou rénales.[1]

d. La grossesse:

Il se produit des modifications de l'activité métabolique des toxiques au cours de la grossesse. Nos connaissances sur l'interaction de tous ces facteurs et de nombreux autres aspects demeurent incomplètes. En effet, il est souvent difficile, sinon impossible, d'évaluer la sensibilité d'un individu ou d'une population et de prédire quelle sera la réponse biologique d'un organisme à une exposition à un toxique.[1]

III.C.3-Les Facteurs extrinsèques:

a. L'État nutritionnel :

La toxicité peut être influencée par la masse de tissus adipeux, la déshydratation, etc.[1]

b. L'environnement:

Certains facteurs environnementaux, c'est-à-dire les éléments extérieurs à l'individu, peuvent influencer la toxicité. La lumière et la température peuvent notamment modifier les effets d'un toxique.

Mentionnons comme exemple la réaction photo- allergique au cours de laquelle la peau exposée à l'éthylène diamine peut devenir plus sensible à la lumière.[1]

III.D- Hyper susceptibilité:

Nous avons préféré hyper susceptibilité pour décrire l'augmentation de l'effet et de la réponse toxique observée chez certains individus d'une population, à hyper sensibilité qui renvoie habituellement à des mécanismes immunologiques.

L'hyper susceptibilité englobe ainsi les phénomènes d'hypersensibilité, dans lesquelles on distingue l'hypersensibilité immédiate (type 1), l'hypersensibilité cytolytique (type 2), l'hypersensibilité à complexes immuns (type 3), et l'hypersensibilité retardée (type 4).[2]

III.E- Les Interactions :

Le terme d'interaction en toxicologie désigne l'influence d'une substance sur la toxicité d'une autre substance. Il y a additivité lorsque l'effet d'une combinaison de substances correspond précisément à la somme des effets des substances individuelles.

On parlera de supra-additivité là où une exposition résulte en un effet supérieur à la somme des effets attendus de la part de chaque substance prise individuellement. Dans le cas de la supra-additivité, on distingue parfois la potentialisation lorsqu'une substance accroît la toxicité d'une autre substance sans produire elle-même l'effet de nature toxicocinétique ou toxicodynamique.

Enfin, le terme d'infra-additivité indique que l'interaction résulte en un effet inférieur à la somme des effets individuels. [2]

CHAPITRE II :

Expérimentation animale

L'expérimentation animale constitue un outil de travail important pour la recherche en toxicologie, comme en biologie ou dans la recherche médicale, il est pertinent de recourir à des modèles cellulaires ou mathématiques afin de mieux comprendre les mécanismes d'effets des substances sur les organismes. Le développement de ces méthodes s'inscrit naturellement dans les avancées des sciences du vivant, mais sans que l'objectif des développeurs soit forcément d'améliorer les prédictions sur les dangers des substances réglementées. [3]

L'expérimentation animale pour la recherche nécessite une validation scientifique, éventuellement une normalisation ou une certification, mais pas obligatoirement une validation au sens réglementaire. La validation réglementaire est, elle, contraignante dans la mesure où une méthode recevable doit apporter, outre ce qui est demandé pour reconnaître scientifiquement une méthode (preuve de sa pertinence, de sa capacité à détecter les effets observés sur l'homme et l'animal), les preuves qu'elle est applicable de façon fiable et répétable en dehors de laboratoires de recherche. [3]

I. L'intérêt de l'expérimentation animale :

I.A - recherche fondamentale :

- ✓ L'expérimentation animale est un outil privilégié de la recherche fondamentale en physiologie animale et humaine et pour l'étude des maladies animales et humaines. Elle permet d'évaluer la capacité des organismes vivants à répondre à des modifications de leur environnement par des mécanismes intégratifs pouvant évoluer sur le long terme.
À ce titre elle reste une composante remplacée de la biologie fondamentale.[4]
- ✓ L'expérimentation animale reste également un outil important de la recherche médicale moderne sur de nombreuses pathologies comme la maladie d'Alzheimer, les maladies infectieuses et le développement de vaccins, les maladies métaboliques comme le diabète, etc.).[4]
- ✓ Elle sert également à développer les nouvelles techniques chirurgicales (greffes, microchirurgie ou neurochirurgie). Les questions posées par la recherche sont fondamentales pour l'identification des mécanismes biologiques. [4]

Aux organismes de s'adapter aux variations des conditions environnementales et aux perturbations internes en situations physiologiques et par voie de conséquence pathologiques.

- ✓ Les progrès de la médecine à un moment ou à un autre du processus de la découverte s'appuient généralement sur les résultats d'expérimentations animales. On peut signaler que plus de 70 prix Nobel de médecine et de physiologie ont récompensé l'acquisition de connaissances obtenues à partir de l'expérimentation animale. [4]
- ✓ Cette expérimentation tient donc une place aujourd'hui très importante dans le processus de la découverte scientifique en biologie et médecine. Des Comités européens comme le SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risk) n'envisagent pas de s'affranchir complètement de ces modèles dans l'état actuel des connaissances.[4]

I.B - risque lié à l'exposition aux agents toxiques :

Aujourd'hui, l'un des grands enjeux de santé publique est la prévention des éventuels effets néfastes liés à une exposition à un ou plusieurs agents chimiques, physiques ou biologiques présents dans notre environnement général, domestique ou professionnel.

- ✓ Les agents toxiques sont des molécules, étrangères à un organisme donné et comprennent les produits chimiques, liés à notre mode de vie, les polluants et contaminants, mais aussi les agents à but thérapeutique (substances médicamenteuses) ainsi que les produits cosmétiques, biocides et phytosanitaires.
- ✓ Les agents physiques il s'agit des champs électromagnétiques produits par exemple par des antennes ou des radars, des vibrations, du bruit, des rayonnements ionisants et non ionisants.
- ✓ Les agents biologiques présentant un risque infectieux comme les virus, les bactéries, les champignons, les parasites, mais aussi les médicaments biologiques tels que les vaccins, les produits biotechnologiques, les toxines (mycotoxines, phycotoxines), les Organismes génétiquement modifiés utilisés en agriculture ou pour les nouvelles thérapies.[4]

I.C - recherche pédagogique :

Des centaines de milliers d'animaux sont soumis à des expériences, sacrifiés et disséqués chaque année dans les écoles et universités du monde entier.

Les défenseurs de l'utilisation des animaux à des fins éducatives revendiquent que l'expérimentation sur des sujets réels représente la meilleure façon d'apprendre et que les classes de travaux pratiques avec des animaux éveillent l'intérêt des étudiants.[4]

Les expérimentations animales occupent aujourd'hui une place centrale dans les démonstrations. Ces études ont pour objectif de renseigner sur :

- ✓ La nature des effets toxiques résultant de diverses conditions d'exposition rigoureusement contrôlées (variété de niveaux, des durées, des voies d'exposition... etc.)
- ✓ Les doses ayant induit ces effets toxiques.
- ✓ La vraisemblance biologique d'un effet suspecté chez l'Homme.[4]

Plus de 50 ans d'études expérimentales de toxicité ont ainsi permis d'améliorer considérablement les connaissances sur les mécanismes d'action d'un grand nombre de substances.

Aujourd'hui, les études toxicologiques ont recours à un ensemble diversifié de modèles expérimentaux.

- ✓ Les tests in vivo réalisés directement sur l'animal.
- ✓ Les tests ex vivo effectués sur un tissu ou un organe ou partie d'organe isolé.
- ✓ Les tests in vitro, ayant généralement recours à l'utilisation de cellules isolées d'origine animale ou humaine, ou d'extraits cellulaires ou de protéines.
- ✓ Les tests in silico permettant d'analyser, grâce à des logiciels informatiques, les propriétés recherchées ou indésirables d'une substance en fonction de sa structure ou de sa réactivité.
- ✓ Les approches intégratives combinant l'ensemble des tests précités.[4]

II- Méthodes d'évaluation de la toxicité in vivo :

Tests pratiqués sur animaux vivants qui ont constitué pendant long temps le point de départ de la toxicologie expérimentale.

Les animaux les plus utilisés sont les rongeurs (rat, souris, cobaye) et dans quelques cas d'autres mammifères (chien, singe, lapin).[5]

II.A- Études de toxicologie générale:

II.A .1-Études de toxicité aiguë par voie systémique :

Étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques et de leur apparition dans le temps après administration unique de la substance ou d'une association de substances.

Les tests de toxicité aiguë servent à déterminer le danger éventuel que représente une exposition ponctuelle à une substance chimique ou à un produit par voie orale, cutanée ou respiratoire.[5]

a. Dose minimale mortelle (DMM):

C'est la dose minimale de substance capable de tuer un animal par administration intraveineuse lente.

La DMM aide l'expérimentateur à choisir les doses à tester pour la détermination de la DL50. [5]

b. Dose létale 50 (DL50):

La DL50 correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises. On administre généralement le produit à des rats ou à des souris répartis en plusieurs groupes, et ce, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 % et 100 %.[5]

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50 (DL50). Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer

les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Elle sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances.

Remarque:

- L'OCDE a fait de la DL_{50} un test officiel (ligne directrice pour les essais 401) en 1981.
- La ligne directrice 401 a finalement été abrogée par l'OCDE, le 17 décembre 2002.
- OCDE décrite trois tests alternatifs :
 - 1) Méthode de la dose prédéterminée (ligne directrice 420, 2001).
 - 2) Méthode de classe de toxicité aiguë (ligne directrice 423, 2001).
 - 3) Méthode ajustement de doses (ligne directrice 425, 2008).

c. Toxicité aiguë par inhalation (CL 50) :

Le principe de cet essai est d'obtenir, avec un processus séquentiel, des informations suffisantes sur la toxicité aiguë par inhalation de la substance d'essai, pour parvenir à son classement avec une exposition de 4 heures.[5]

II.A .2-Étude de toxicité aiguë par voie locale :

Permet l'évaluation du potentiel irritant (réversible), corrosif (irréversible) ou sensibilisant de substance après administration locale (peau, œil, muqueuse).[5]

a. Test D'irritation / corrosion cutanée (OCDE n° 402) :

Une seule dose de la substance d'essai est appliquée sur la peau de l'animal (lapin albinos) choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. La peau est préalablement tondu à ras, 24 heures avant l'essai, puis on applique 0,5 ml du produit (0,5 g s'il est solide) sur une petite zone recouverte par une compresse de gaze.

La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés (érythème/œdème). [6]

b. Test d'irritation/ corrosion oculaire (OCDE n° 405) :

L'irritation oculaire désigne des altérations oculaires qui surviennent à la suite de l'application d'une substance d'essai, à raison de 0,1 ml (Moins de 100 mg pour un solide) sur la surface antérieure de l'œil, et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant le traitement. [7]

Les critères mesurés sont:

- L'opacité et la surface de la cornée atteinte.
- Gonflement, insensibilisation à la lumière de l'iris.
- Atteinte de la conjonctive (yeux rouges et larmes).

On détermine l'indice d'irritation oculaire (IIO) qui est l'addition de toutes les notes pour chaque observation.

Si : IIO < 15 = faiblement irritant
Si : 15 < IIO < 30 = moyennement irritant
Si : 30 < IIO < 50 = irritant
Si : 50 > IIO = très irritant [7]

c. Études de toxicité chronique (OCDE n° 452) :

Certains effets néfastes peuvent prendre plusieurs semaines ou de nombreuses années avant d'être diagnostiqués et éventuellement se révéler irréversibles (ex : la neurotoxicité de l'hexane).

Les études de toxicité chronique permettront d'identifier la majorité des effets et la détermination de la relation dose effet, par administration du produit à tester pendant une longue période. [8]

II.B- Eudes de toxicologie spécifique:

II.B.1- Études de reprotoxicité:

L'objectif poursuivi par l'Union européenne est d'évaluer la toxicité sur la reproduction d'une substance chimique en couvrant tous les stades de la reproduction que ce soit la fonction et la capacité de reproduction chez l'homme et la femme, l'induction d'effets non héréditaires dans la descendance, tels que la mort, les retards de croissance, les effets structuraux ou fonctionnels. [9]

II.B.2- La mutagénicité (effet mutagène):

a. Test d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifère (OCDE n° 475) :

Le test in vivo d'aberration chromosomique est destiné à identifier les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs.[10]

b. Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifère (OCDE n° 474) :

Le test du micronoyau in vivo sur des cellules de mammifère est pratiqué en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il repose sur l'analyse d'érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse et/ou dans le sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs.[11]

Les lames préparées sont soumises à une analyse en vue de la détection de micronoyaux.[11]

II.B.3- Étude de la cancérogenèse (OCDE n° 451) :

L'étude de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes.

La substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux, pendant la plus grande partie de leur vie, à des doses progressives et habituellement par la voie orale.

Les essais par inhalation ou par la voie cutanée peuvent aussi être appropriés. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés. [12]

III-Avantages et inconvénients des tests in vivo :

III.A-Avantages:

- Ils sont beaucoup plus proches de la clinique.
- ils permettent d'évaluer les effets d'un matériau sur des organes loin de l'organe cible.
- Ils permettent d'évaluer la toxicité des métabolites. Un matériau peut en effet se révéler biocompatible alors que ses produits de dégradation, une fois métabolisés par l'organisme se révèlent être dangereux.
- L'interprétation des résultats est parfois plus facile, car le rapport avec la clinique est souvent plus évident.[5]

III.B-Inconvénients:

- Les tests réalisés sur des animaux de laboratoire (deux espèces de mammifères) peuvent ne pas avoir de rapport avec l'espèce humaine.
- L'effet néfaste peut passer inaperçu s'il est non recherché donc non évalué.
- Timing incorrect de l'essai (l'effet délétère se manifeste après les périodes d'observation) l'évaluation et l'interprétation des résultats peut-être difficile.
- Il peut être difficile de simuler la pathologie préexistante (carie, lésion parodontale). [5]

CHAPITRE III :

LES METHODES ALTERNATIVES

I - La place des méthodes alternatives dans les cadres législatif et réglementaire :

Le terme alternatif a été inventé en 1978 par l'éminent physiologiste *David Smyth* dans son ouvrage *alternatif to Animal Experiments* [alternatives aux études expérimentales sur les animaux]. Ce mot est utilisé pour décrire toute modification aux procédures scientifiques établies qui a pour résultat le remplacement de l'utilisation des animaux, la réduction du nombre d'animaux utilisés ou le raffinement des techniques qui peuvent réduire la douleur chez les animaux. Par conséquent, le terme de Smyth, « alternative », possède le même sens que les «Trois R » de *Russell et Burch*. [4]

Les méthodes alternatives basées sur des cultures cellulaires (lignées ou cellules isolées à partir d'organes ou de tissu – culture primaire d'un type cellulaire isolé – des co-cultures et des modèles de tissus reconstruits à partir de types cellulaires différents) sont les plus utilisées. Leur intérêt principal est d'offrir la possibilité d'utiliser des cellules humaines (même si les cellules animales le sont également du fait de leur approvisionnement facile), ce qui permet a priori une extrapolation plus pertinente des résultats à l'Homme. [4]

Pour une utilisation dans un cadre réglementaire, ces méthodes doivent être reconnues ou validées. La validation consiste tout d'abord à prouver le concept, c'est-à-dire que la méthode répond aux résultats souhaités. C'est une étape scientifique réalisée par les pairs. La validation dite « réglementaire », par exemple par l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). [3]

I.A- La règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer :

Après avoir gradué les souffrances subies par les animaux en expérimentation dans les laboratoires anglais, *W.M.S. Russell et R.L. Burch* ont développé un programme de mise en place et de développement de lignes directrices dites "humaines ", appelé la "règle des 3 R" et comprenant les points suivants :

- ✓ **Reduce** : (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation.
- ✓ **Refine** : (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points Limites (critères d'interruption, ou "end-points").
- ✓ **Replace** : (remplacé) les modèles animaux.

Ce concept a été progressivement adopté par diverses institutions pour fixer des lignes de conduite pour l'expérimentation animale.[13]

I.A.1- Réduire :

Cet objectif, initialement de bonnes pratiques en expérimentation animale, a, depuis Russell et Burch, été introduit dans la réglementation. Il figure à titre de recommandation dans le préambule de la convention 123 (convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques) et de la directive 2010/63/ ainsi que dans leur traduction en droit français.[13]

a. Utiliser moins d'animaux en expérimentation peut être réalisé par différentes voies :

Limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, réduction des répétitions inutiles.

Il ne s'agit pas ici d'aller à l'encontre d'un des principes fondamentaux de la méthode expérimentale qui exige la confirmation de résultats originaux par des pairs indépendants, mais d'éviter la répétition d'études antérieures, faites dans un autre pays et destinées à répondre à des exigences législatives/réglementaires nationales ou communautaires (directive n° 86/609/) en vue d'une autorisation de mise sur le marché ou d'une vérification d'innocuité/toxicité.

Des efforts d'harmonisation au plan européen/international des réglementations de sécurité (ex. essais toxicologiques), de rapprochement des normes en vigueur (protection de la santé humaine et animale et de l'environnement) et de reconnaissance mutuelle de la validité des protocoles et des données scientifiques permettent de diminuer le nombre d'études exigées par les diverses autorités étatiques et donc le nombre d'animaux utilisés.[13]

b. Rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation :

Dans l'idée qu'une étude bien préparée a de fortes chances de fournir des résultats concluants, qu'il sera inutile de vérifier par d'autres essais portant sur de nouvelles séries d'animaux. Ce qui peut permettre d'aboutir au :

1) Rejet d'investigations discutables :

Il est du ressort d'un comité d'éthique de proposer des améliorations aux protocoles expérimentaux dont les objectifs ne sont pas clairs, les procédures insuffisamment détaillées, les modèles animaux inadaptés ou le nombre d'animaux inadéquat, et de rejeter le protocole si le demandeur n'accepte pas d'appliquer les améliorations demandées.[13]

2) L'utilisation des statistiques :

Lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.[13]

3) Partage d'animaux en expérimentation :

Entre collègues menant des travaux de recherche soit voisine avec des techniques différentes, soit différents, mais compatible entre eux, l'utilisation d'animaux homogènes sur le plan des caractères biologiques et, entre autres, sur celui de l'état sanitaire, permet de réduire autant que

faire se peut la variabilité d'un individu à l'autre. et l'exploitation maximale des données obtenues lors d'une expérimentation.

S'il est essentiel d'organiser les expérimentations indispensables de telle façon qu'elles permettent l'obtention de résultats exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possibles, il faut néanmoins éviter que cet effort de réduction ne se traduise par l'obtention de résultats moins fiables.[13]

I.A. 2- Raffiner :

Le concept de raffiner, autrement dit optimiser l'expérimentation, concerne la méthodologie appliquée aux animaux dans l'optique. Afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux, et d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal-être" animal.

Ce souci de raffinement doit être une préoccupation permanente tout au long de la vie des animaux et pendant les différentes étapes du protocole expérimental.[13]

a. Raffiner avant l'expérimentation :

- ✓ Choisir avec soin le modèle animal utilisé en prenant en compte l'état actuel des connaissances, ceci concerne aussi bien la pertinence du choix de l'espèce que le protocole lui-même, améliorer les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement (soins, enrichissement du milieu) des animaux dans le but d'augmenter autant que possible leur bien-être.
- ✓ Planifier correctement le protocole de façon à éviter des perturbations susceptibles de limiter la validité de l'expérience (animaux stressés par une surpopulation dans les salles d'hébergement ou par une entrée dans un protocole sans période d'acclimatation par exemple), et de conduire à ne pas réaliser la totalité de l'expérimentation dans les conditions optimales (disponibilité des locaux d'expérimentation, du matériel, etc.).
- ✓ Entraîner les animaux à coopérer (renforcement positif) pour certaines procédures de manière à diminuer le stress de l'animal et éviter le recours à l'anesthésie pour des actes non invasifs et non douloureux établir des points limites les plus précoces possible en fonction de l'objectif de l'expérimentation. Dans ce domaine un des rôles les plus positifs des comités d'éthique en expérimentation animale sera de conseiller sur l'évaluation de la balance "coût/bénéfice" du projet.[13]

b. Raffiner pendant l'expérimentation :

Il faut envisager, chaque fois que possible :

- ✓ Accorder la préférence à des procédures non invasives (imagerie, in vivo, télémétrie).
- ✓ Donner les soins pré-, per- et postopératoires adéquats.
- ✓ Recourir à l'anesthésie/analgésie.
- ✓ Éviter les tests douloureux (test de Draize, test d'irritation de la peau, emploi d'adjuvants) chaque fois que des méthodes substitutives existent.

- ✓ Réduire la durée de certaines études surtout toxicologiques.
- ✓ Étudier des situations aiguës plutôt que chroniques.
- ✓ Appliquer les points limites établis préalablement.
- ✓ Utiliser les procédures d'euthanasie appropriées.[13]

c. Raffiner après l'expérimentation:

Revient à exploiter au mieux les résultats obtenus lors de l'expérimentation (ex : études statistiques).[3]

I.A. 3- Remplacer :

Cette pétition de principe encourage le chercheur à remplacer chaque fois que cela est possible le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro* ou "*in silico*" (modèles mathématiques, bio-informatique). Elle peut être applicable dans de nombreux domaines, en particulier dans les études de sécurité au sens large, à condition que le modèle utilisé ait été dûment validé et soit utilisé dans le champ d'application de sa validation.

Cependant il est clair que dans l'état actuel des connaissances, ces méthodes sont la plupart du temps des méthodes complémentaires d'un projet global quand elles ne constituent pas en soi un objet de recherche.

Il existe une forte pression du législateur comme l'opinion publique pour encourager le développement de ces méthodes dites "alternatives" qui peuvent constituer de réelles voies de substitution dans certains segments de la recherche fondamentale et en recherche appliquée.[13]

II- Méthodes d'évaluation de la toxicité *in vitro*

II.A- Les alternatives aux tests d'irritabilité :

II.A.1- Test d'Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué (OCDE 439) :

L'irritation cutanée consécutive à l'application d'un produit chimique, qui se manifeste principalement par des érythèmes ou des œdèmes, résulte d'une cascade d'événements débutant par la pénétration du produit chimique à travers le stratum corneum où il peut causer la lésion des couches sous-jacentes des kératinocytes et des autres cellules de la peau.[14]

Principe:

Le produit chimique est appliqué localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un *stratum corneum* multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, similaires à celles que l'on observe *in vivo*. [14]

On calcule, ensuite, le pourcentage de viabilité cellulaire normalisé par rapport au témoin négatif, lequel correspond à une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 %. [14]



Figure 3: Épiderme humain reconstitué (in vitro) [14]

II.A.2- Test de fixation du rouge neutre : Test de phototoxicité (OCDE n° 432) :

Le test de phototoxicité repose sur la comparaison de la cytotoxicité d'une substance chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique de lumière solaire simulée. Dans cet essai, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre [Neutral Red - NR] 24 heures après traitement par le produit chimique mis à l'essai et irradiation.

Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par non-diffusion, et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes.[15]

Si la membrane cellulaire ou les lysosomes sont endommagés par une substance chimique irritante, la teinture s'échappe par les membranes perméables.

Un spectrophotomètre mesure la quantité de teinture échappée.

II.A.3- Tests d'Eyetex:

Le test Eyetex utilise une matrice synthétique d'une protéine d'origine végétale extraite du pois sabre. Limpide, cette matrice devient opaque après addition d'un irritant oculaire.

Les changements dans la structure de la protéine qui sont induits par la substance d'essai peuvent être facilement quantifiés en mesurant les changements résultant de la turbidité (DO405) de la solution de réactif. La quantification du degré d'opacité (dégâts) par un spectrophotomètre, est bien plus fiable que l'estimation des dégâts (rougeur et gonflement) par le test de Draize.

II.A.4- Test de HET-CAM la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule :

Cette technique consiste à prélever un échantillon de la membrane chorioallantoïdienne (MCA), membrane vasculaire respiratoire recouvrant l'embryon de poulet à l'intérieur de l'œuf, puis d'appliquer à sa surface la substance testée. Il est ensuite possible d'évaluer l'altération du système vasculaire de la MCA sous l'effet de l'agent testé. En effet, après un temps d'incubation variable selon le protocole utilisé, les modifications morphologiques telles que la survenue d'une hémorragie, d'une vasoconstriction ou de phénomène de coagulation sont notées, ainsi que leur délai d'apparition en secondes. Pour diminuer la subjectivité du test, il est également possible

d'utiliser un colorant, le bleu trypan, afin d'évaluer les altérations cellulaires, permettant également de tester des produits colorés. [16]

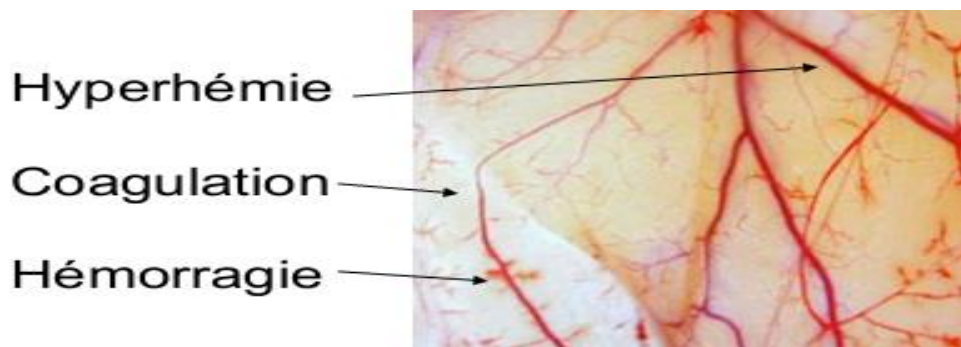


Figure4 : Phénomènes observés dans le HET-CAM test [16]

II.A.5- Test sur œil de poulet isolé (opi) (OCDE n° 438) :

La méthode d'essai OPI est un modèle organotypique qui permet le maintien à court terme d'yeux de poulet in vitro. Selon cette méthode, les dommages provoqués par le produit chimique testé sont évalués par détermination du gonflement, de l'opacité et de la rétention de fluorescéine de la cornée. Ces derniers servent à déterminer une catégorie OPI par effet mesuré. Ces catégories sont ensuite combinées en une classification d'effet irritant pour chaque produit chimique testé. [17]

II.B- Tests de mutagenèse:

II.B .1- Test d'Âmes mutation reverse sur bactéries (OCDE n° 471) :

L'essai bactérien de mutation reverse est pratiqué sur des souches de *Salmonella typhimurium* et d'*Escherichia coli* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Il sert à détecter des mutations ponctuelles résultant de la substitution, de l'addition ou de la délétion d'une ou de plusieurs paires de base de l'ADN.[18]

Des bactéries en suspension sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. Après deux ou trois jours d'incubation, les colonies révertantes sont comptées et leur nombre est comparé à celui des revenants spontanés dans les boîtes témoins traitées avec le solvant.[18]

Des résultats positifs obtenus à l'essai de mutation réverse sur bactéries indiquent que la substance induit des mutations ponctuelles par substitution de base ou décalage du cadre de lecture dans le génome de bactéries.

Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance n'est pas mutagène pour l'espèce utilisée dans l'essai.[18]

II.B .2-Test de mutation génique sur cellules de mammifère (OCDE n° 476) :

Le test in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères permet de détecter des mutations géniques induites par des substances chimiques.[19]

Les cellules déficientes en thymidine kinase (TK) par suite de la mutation directe TK +/- → TK-/- sont résistantes aux effets cytotoxiques de la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la pyrimidine. Les cellules non déficientes en TK sont sensibles à la TFT, ce qui entraîne une inhibition du métabolisme cellulaire et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, les cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT, tandis que les cellules normales, qui contiennent du TK, ne le peuvent pas. De la même façon, des cellules déficientes en HPRT ou XPRT sont sélectionnées par leur résistance à la thio-6 guanine (TG) ou à l'aza-8 guanine (AG). [19]

II.B .3- Test de synthèse non programmé de l'ADN (OCDE n° 482) :

Le test de synthèse non programmé de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mesure la synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant la région lésée par des agents chimiques et physiques.[20]

Principe:

L'essai est basé sur l'incorporation de thymidine traitée (3 H-TdR) dans l'ADN de cellules de mammifère ne se trouvant pas en phase S du cycle cellulaire. On peut déterminer l'incorporation de 3 H-TdR dans le cytoplasme en examinant par autoradiographie ou par comptage en scintillation liquide.

Les cellules de mammifère en culture, à moins que des hépatocytes primaires de rat ne soient utilisés, sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène.[20]

II.B .4- Test d'échange de chromatides –sœurs :

Le test d'échange des chromatides-sœurs SCE constitue un test à court terme destiné à déceler les échanges réciproques d'ADN entre deux chromatides-sœurs d'un chromosome se dédoublant. [21]

Les cellules de mammifère in vitro sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène de mammifère, le cas échéant, et mises en culture pendant deux cycles de réplication dans un milieu contenant de la BrdU. Après traitement avec un inhibiteur du fuseau (par exemple colchicine) afin d'accumuler les cellules en phase de mitose de type métaphasique (c-métaphase), les cellules sont récoltées et des préparations de chromosomes sont réalisées.[21]

Les préparations de chromosomes sont effectuées par des méthodes cytogénétiques standard. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour colorer les lames de manière à faire apparaître les SCE (par exemple la méthode par fluorescence plus Giemsa). [21]

II.B .5- Test d'aberration chromosomique in vitro sur cellules de mammifère (OCDE n° LD 473) :

Le test d'aberration chromosomique in vitro est destiné à détecter les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules de mammifère. [22]

Les aberrations de structure peuvent être de deux types chromosomiques ou chromatiniennes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des aberrations de type chromatidien, mais parfois de type chromosomique. [22]

Le test d'aberration chromosomique in vitro peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies, des souches cellulaires ou des cultures de cellules primaires. Les cellules utilisées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype, du nombre et de la diversité des chromosomes et de la fréquence des aberrations chromosomiques spontanées. [22]

Principe:

Des cultures de cellules sont exposées à la substance d'essai avec et sans activation métabolique. Après avoir été exposées à la substance d'essai, les cultures de cellules sont, à intervalles préétablis, traitées par une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple de la colchicine), récoltées et teintées. Les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique afin de déceler les aberrations chromosomiques. [22]

II.B .6-Test de micronoyaux in vitro sur cellules de mammifère (OCDE n° LD 487) :

Le test in vitro de micronoyaux est un essai de génotoxicité consistant à mettre en évidence d'éventuels micronoyaux dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent avoir pour origine des fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire dépourvus de centromère) ou des chromosomes entiers incapables de migrer vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase.[23]

Les cultures cellulaires d'origine humaine ou mammifère sont exposées à la substance d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines. Tous les essais prévoient l'utilisation de témoins négative et de témoins positifs.[23]

Toutes les lames, y compris celles des témoins de solvant, des témoins non traités (s'il y en a) et des témoins positifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope des fréquences de micronoyaux.[23]

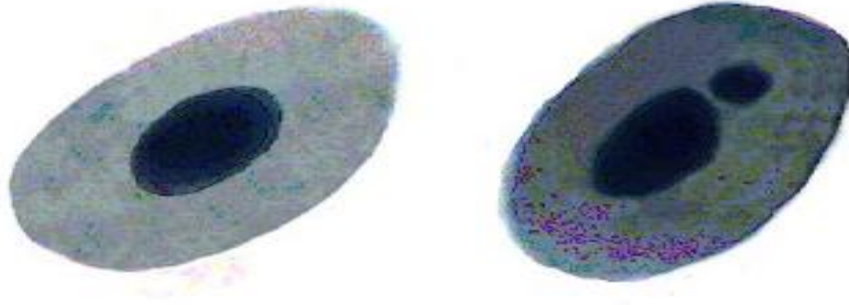


Figure 5 : présentation du micronoyau sur les cellules de mammifère [23]

II.B .7-Test des comètes

Le test des comètes permet de quantifier les lésions primaires de l'ADN, notamment les cassures de l'ADN, qui représentent une des lésions à forte probabilité d'apparition après exposition à des agents mutagènes. Sur le plan technique, ce test des comètes (ou "*single cell gel electrophoresis assay*") correspond à une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées. [24]

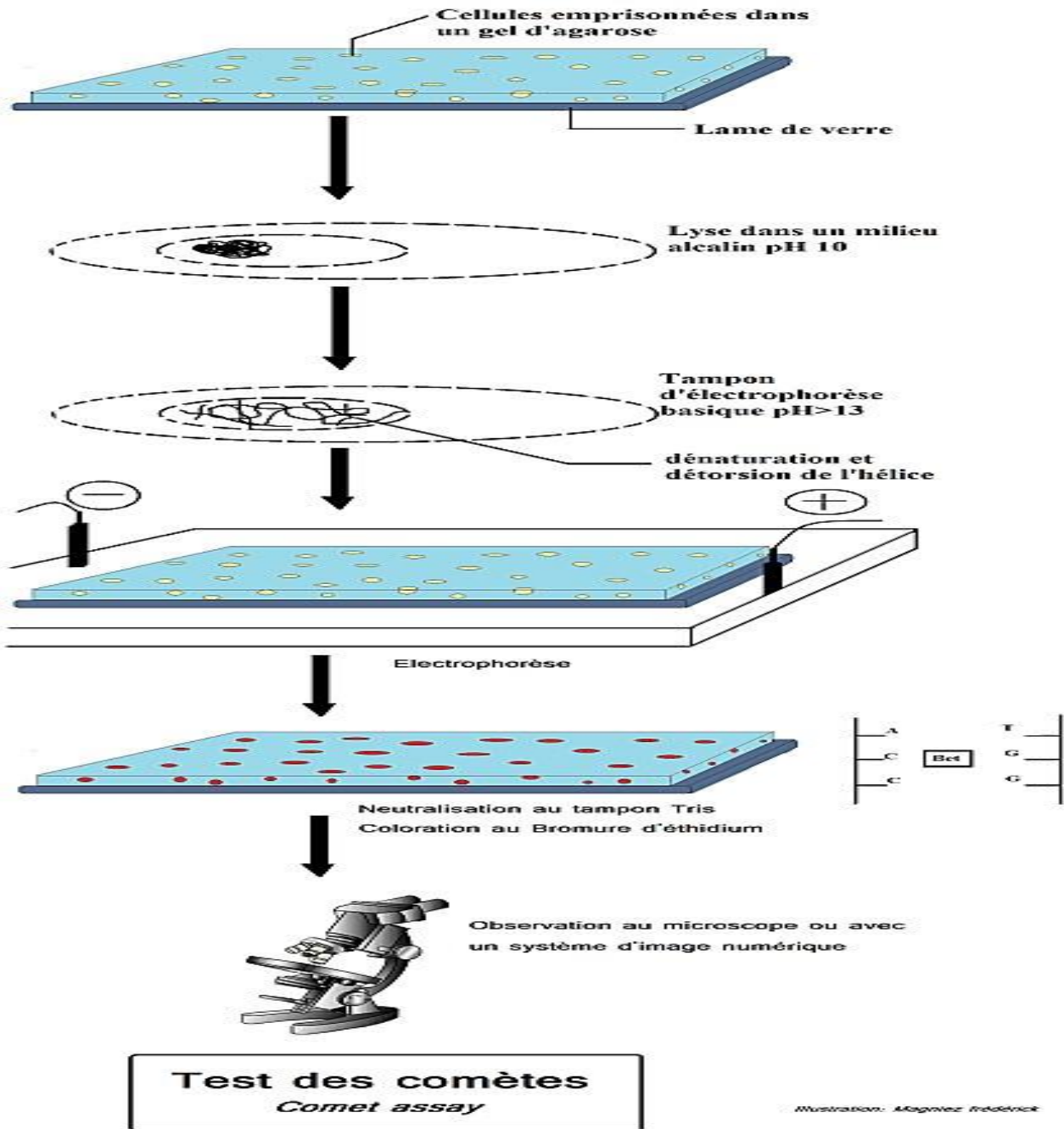


Figure 6 : Test des comètes [24]

III- Avantages et limites des méthodes in vitro:

III.A - Les Avantages:

- ✓ Multiplier les essais.
- ✓ Suivre avec précision un phénomène dans le temps.
- ✓ Expliquer un mécanisme d'action.

- ✓ Prédire la proportion de faux négatifs et de faux positifs.
- ✓ Limiter le nombre d'animaux d'expérience : avantage éthique.
- ✓ Les essais sur des cellules humaines permettent d'éviter la différence d'espèce. [5]

III.B - Les Limites :

- ✓ Les cellules en culture ne rendent pas compte de la complexité de l'organisation du vivant dans sa globalité.
- ✓ Elles ne reflètent donc pas la réalité physiologique.
- ✓ Elles ne permettent pas d'établir des corrélations précises entre dose et toxicité. [5]

PARTIE PRATIQUE

OBJECTIFS PRATIQUE

Le recours à des méthodes alternatives en expérimentation animale est aujourd'hui une nécessité, eu égard notamment aux exigences réglementaires qui requièrent des résultats rapides et fiables sur les propriétés toxiques des substances chimiques. De plus, elles sont nécessaires pour répondre aux préoccupations sociétales autour d'une démarche éthique en expérimentation animale. Pour une utilisation dans un cadre réglementaire, ces méthodes doivent être reconnues et/ou validées.

L'objectif de notre travail est de tester une méthode alternative au test de Draize, nous avons choisi pour cela le test HET-CAM pour déterminer le potentiel d'irritation oculaire de certains produits cosmétiques avant leur mise sur le marché.

Nous allons essayer de prouver l'utilité de la méthode pour le dépistage des produits cosmétiques pouvant présenter un risque de lésions oculaire et les classer en fonction de leur potentiel d'irritation en produits irritants, modérément irritants, faiblement irritants et non irritants.

CHAPITRE I :

Revue bibliographique du HET-CAM test

INTRODUCTION

L'œil, organe externe, sensoriel et richement innervé, est particulièrement exposé et sensible aux xénobiotiques. Ainsi en 1944 une procédure est décrite chez le lapin, permettant l'évaluation de la tolérance des produits: le test de Draize. Celui-ci est actuellement toujours en vigueur pour assurer l'innocuité des produits cosmétiques. Cependant de nombreuses critiques émanent des scientifiques et des associations protectrices des animaux ont été formulées. Ainsi le test de Draize est de plus en plus sujet à controverse, et de ce fait le législateur tend à réduire ou à interdire l'utilisation de ce test pour l'étude de la tolérance oculaire des produits cosmétiques. Dans le même temps, un grand nombre de méthodologies in vitro ont été développées pour assurer l'innocuité de ces produits de façon schématique. Ces tests ont deux objectifs :

1- D'une part, sélectionner précocement les molécules présentant le meilleur rapport coût/efficacité; (toxicologie de criblage ou de sélection).

2- D'autres part, expliquer le mécanisme des effets toxiques (toxicologie explicative).[25]

Finalement, ces tests permettent surtout de réduire le nombre de molécules qui devront être soumises à l'ensemble de l'expérimentation animale extrêmement coûteuse. Les méthodes alternatives qui viennent d'être mises au point représentent une contribution importante aux trois « R ».

La recherche de méthodes alternatives in vitro est donc un sujet de recherche majeur dans le domaine de la toxicologie.[25]

I - HET-CAM test : Hen's egg test chorio-allantoic membrane

I.A- Propriétés de la membrane chorio-allantoïdienne :

La membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf de poule embryonné est formée par la fusion d'une couche mésodermique de l'allantoïde et d'une couche mésodermique de la séreuse. Cette structure stratifiée comporte une couche interne endodermale, une couche ectodermale et un mésoderme central richement vascularisé, qui forment un réseau en connexion avec la vascularisation

embryonnaire par les artères et veines allantoïdes. Sa fonction primaire est celle d'un organe respiratoire pour l'embryon de poulet. Elle joue également un rôle dans la résorption du calcium et dans les processus d'excrétion. Si son emploi a été envisagé comme méthode alternative, c'est parce qu'il s'agit d'une membrane vivante, possédant un système de vascularisation fonctionnel et approprié à l'étude de la réaction inflammatoire. Ce test n'est pas encore décrit officiellement par une ligne directrice de l'OCDE.[26]

Plusieurs variantes de cette technique ont été décrites. Toutes exigent que le produit à tester soit appliqué sur la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) d'un œuf fécondé de poule, incubé pendant dix jours. À cette période de développement embryonnaire, les tissus nerveux et donc la sensation de douleur ne sont pas encore développés. Ceci permet ainsi d'être en accord avec la législation européenne qui interdit des tests sur des embryons plus âgés.[26]

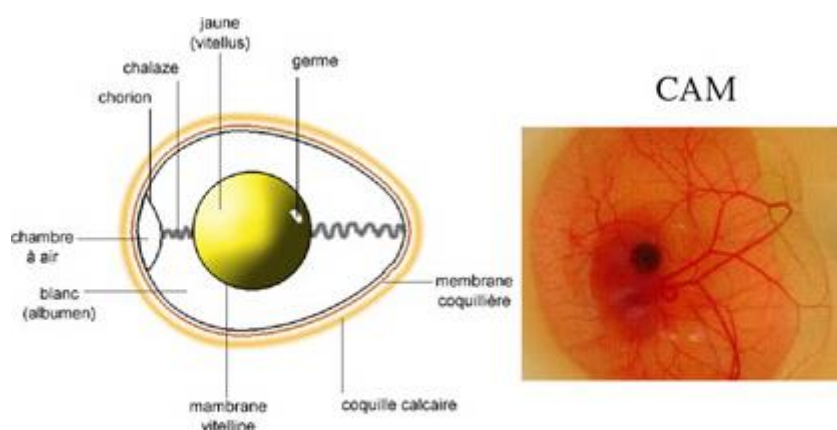


Figure 7 : Présentation de la membrane CAM [16]

I.B- Historique du test:

Le test HET-CAM est déjà utilisé dans l'industrie pour identifier des matériaux légèrement irritants lors du dépistage et de la sécurité dans la maison. [27]

Pour l'évaluation de formulations et/ou de matières premières, il n'est pas couramment utilisé pour les évaluations des risques au sens de l'étiquetage et de classification, car il n'a pas encore été reconnu comme une alternative généralement acceptée pour le test in vivo draize sur les lapins.

Cependant, le test HET-CAM a déjà été accepté par les Britanniques, les Français, les autorités néerlandaises et allemandes pour la classification des irritants graves.[27]

Cette méthode est une alternative à l'expérimentation animale pour l'évaluation du potentiel irritant des produits cosmétiques. Elle a été développée par *LUEPKE* (*LUEPKE, 1985*) mais de nombreuses variantes ont été en suite développées.[27]

L'approche la plus répandue consiste à déterminer le temps de survenue des réactions après l'exposition. Une autre technique consiste à déterminer la concentration de produit pour laquelle chacune de ces réactions apparaît. Cependant même si différentes techniques d'évaluation existent, le test original a pour but de donner un score pondéré en fonction des différents paramètres.

L'étude internationale menée par la commission européenne et le ministère de l'intérieur britannique a déterminé que le test HET-CAM ne remplissait pas toutes les conditions pour remplacer le test de Draize.

Cependant, la majorité des études montrent une corrélation intéressante entre le test de Draize et le test HET-CAM.[27]

Chapitre II:

Essai proprement dit

I-Objectif et principe

Cette méthode est une alternative à l'expérimentation animale pour l'évaluation du potentiel irritant des produits cosmétiques.

Le principe en est basé sur l'observation, par une personne entraînée, des effets irritants (hyperémie, hémorragie, coagulation) pouvant survenir dans les cinq minutes suivant le dépôt d'un produit sur la membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'œuf de poule embryonné, au dixième jour d'incubation.

Dans le cas des produits cosmétiques, notamment à base de tensioactifs, cette méthode est applicable à l'évaluation du potentiel irritant oculaire. [16]

II-Échantillonnage

Nous avons travaillé sur des échantillons recueillis au niveau du laboratoire de toxicologie du CHU de Constantine émanant des différents importateurs de produits cosmétiques auxquels on exige la conformité de mise sur le marché.

Pour la détermination du pouvoir d'irritation oculaire, on a effectué le test HET-CAM sur 19 produits cosmétiques.

Notre échantillonnage est constitué de :

Tableau 3 : Liste des produits cosmétiques utilisés

N°	Nature
1	Shampooing
2	Shampooing
3	Shampooing
4	Shampooing
5	Shampooing deux en un
6	Shampooing deux en un
7	Après shampooing
8	Après shampooing
9	Gel Douche
10	Gel Douche
11	Savon liquide
12	Nettoyant de visage
13	Nettoyant de visage
14	Nettoyant de visage
15	Nettoyant de visage
16	Gommage
17	Crème de jour
18	Crème de jour
19	Crème de nuit

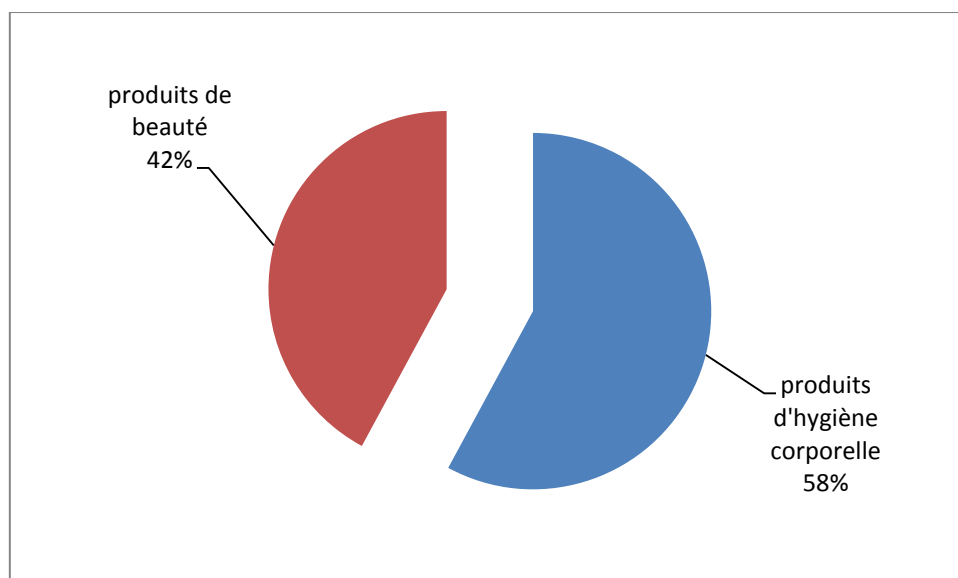


Figure 8 : Répartition des produits testés selon leur utilisation

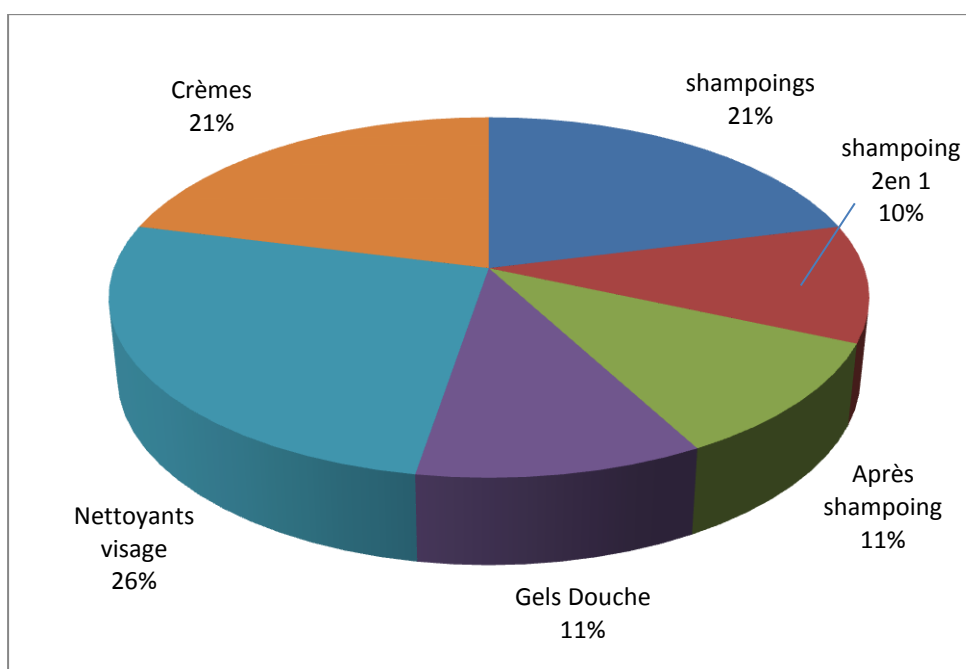


Figure 9 : Répartition des produits utilisés selon la nature

III-Matériels et méthodes

III.A-Matériels

III.A.1-Réactifs

- ✓ Soluté isotonique de NaCl à 0,9%.
- ✓ Solution de NAOH 10 %.
- ✓ Eau distillée (dilution des échantillons).

III.A.2-nstrumentation

- ✓ Œufs de poule embryonnés (la souche White Leghorn est recommandée), d'un poids compris entre 50 et 65 g le jour de la réception.
- ✓ Incubateur à œufs.
- ✓ Lampe à mirer les œufs.
- ✓ Pince anatomique droite (pince à disséquer, brucelles ...) à bouts mousse et sans mors.
- ✓ Ciseaux à bouts ronds.
- ✓ Chronomètre.
- ✓ Pipettes, tubes à essai, béchers...
- ✓ Seringues de 1 ml à 5 ml.
- ✓ Balance de précision.

III.B-Méthodes : méthode alternative au Draize oculaire (test HET-CAM)

❖ Protocole

✓ *Réception des œufs*

Dès réception, les œufs fêlés ou cassés sont éliminés. Les autres sont conservés à l'abri de la lumière et à une température de 1 °C à 12 °C (enceinte ou local adapté) pendant au moins vingt-quatre heures avant de les placer en couveuse.[16]

✓ *Mise en couveuse*

- Les œufs sont pesés et identifiés puis placés dans l'incubateur (température optimale : 37,8 °C, humidité comprise entre 50 et 60%).
- Si l'incubateur n'est pas équipé d'un système de retournement automatique, les œufs doivent être retournés manuellement au moins deux fois par jour.
- Pendant toute la durée de l'incubation, la température et l'humidité sont contrôlées et réglées si nécessaire.
- Les œufs sont placés en position verticale (poche d'air vers le haut) dès le début dans le cas d'incubateurs équipés de plateaux oscillants et au huitième jour d'incubation dans les autres cas. [16]

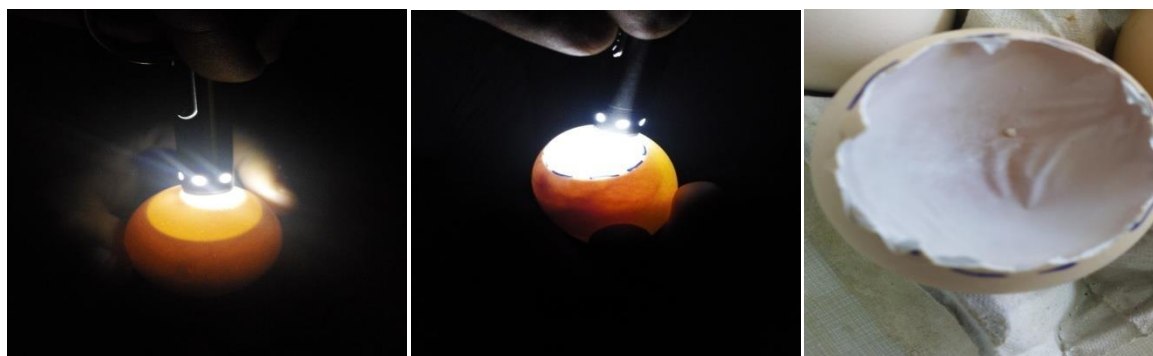
✓ *Vérification des œufs*

Au dixième jour d'incubation, les œufs sont mirés et les œufs défectueux sont rejetés.

Les différentes étapes de l'essai sont enchaînées rapidement sous un éclairage d'une intensité suffisante ne dégageant pas de chaleur afin de ne pas dessécher la MCA. Dans le cas contraire, l'atmosphère est humidifiée à l'aide, par exemple, d'un brumisateur.[16]

✓ *Préparation 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. (1)(2)(3) [16]



-1-

-2-

-3-

Figure 10 : Indication de la chambre à air

Toute la surface de la membrane coquillière est alors humidifiée avec du soluté isotonique de chlorure de sodium tiédi à 37 °C.

Le soluté est ensuite éliminé par inclinaison de l'œuf.

Avec une pince la membrane coquillière est décollée délicatement puis retirée afin de découvrir la membrane chorio-allantoïdienne sous-jacente. (3)(4) [16]



-3-

-4-

Figure 11 : préparation de la CAM

Tout œuf dont la membrane chorio-allantoïdienne est défectueuse ou présente des traces d'hémorragie est rejeté.

❖ L'effet irritant du produit à l'essai (ou de chacune de ses dilutions) est évalué sur trois œufs. [16]

✓ *Préparation de 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. [16]

➤ Déclenchement du chronomètre : 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.[16]




✓ *Procédure de 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. [16]

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

Tableau 4 : Critères d'évaluation du HET-CAM [16]

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)	Opacité : 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, ...). Thrombose : 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 5 : Notation en fonction du temps [16]

Phénomène	Temps	Score
Hyperémie	t inférieure ou égal à 30 s	5
	t supérieure à 30 s et inférieur 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 inférieur 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 inférieur 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 21.[16]

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 6 : Expression des résultats selon la notation [16]

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.

IV-Résultats

IV.A- Présentation des scores obtenus :

Le tableau ci-dessous représente les scores obtenus selon le degré d'irritation des produits testés.

Tableau 7 : Présentation des scores selon le degré d'irritation

N°	Phénomènes	Temps d'apparition	Score	Score des œufs		
1	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 10 sec 00 min 30 sec 01 min 00 sec	5 9 5	19	
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 07 sec 00 min 30 sec 01 min 30 sec	5 9 5		
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 00 min 45 sec 01 min 13 sec	5 7 5		
2	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 02 min 10 sec 01 min 00 sec	5 5 5	15	
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 23 sec 02 min 50 sec /	5 5		10
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 18 sec 02 min 30 sec /	5 5		
3	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 02 min 10 sec 03 min 30 sec	5 5 3	13	
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 35 sec 01 min <coa<02 min /	3 7		10

	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 00 min 50 sec <02 min	5 7 5	17
4	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 37 sec 02 min 20 sec 03 min 00 sec	3 5 3	11
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 32 sec 02 min 30 sec /	3 5	8
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 01 min 00 sec /	5 7	12
5	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 20 sec /	5 7	12
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 20 sec /	5 7	12
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 20 sec /	5 7	12
6	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 10 sec 02min<hém<03min	5 7 3	15
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 00 min 50 sec 01 min 50 sec	5 7 5	17
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 00 min 50 sec 01 min 50 sec	5 7 5	17
	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec / /	3	3

7	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec / /	3	3
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec / /	3	3
8	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	01 min 00 sec / /	3	3
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	01 min 00 sec / /	3	3
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	01 min 00 sec / /	3	3
9	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 32 sec 01 min 50 sec /	3 7	10
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 45 sec /	5 7	12
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 45 sec /	5 7	12
10	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 01 min 30 sec /	5 7	12
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 01 min 25 sec /	5 7	12
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 01 min 25 sec /	5 7	12
		Hyperémie Coagulation	00 min 30 sec 01 min 30 sec	5 7	12

11	E1	Hémorragie	/		
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 01 min 35 sec /	5 7	12
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 00 min 40 sec /	5 7	12
12	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 01 min 00 sec /	5 7	12
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 00 min 50 sec /	5 7	12
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 00 min 30 sec /	5 9	14
13	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 00 min 50 sec /	5 7	12
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 00 sec /	5 7	12
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 00 min 40 sec /	5 7	12
14	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 43 sec 02 min 10 sec /	3 5	8
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 45 sec 02 min 30 sec /	3 5	8

	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	01 min 00 sec 01 min 50 sec /	3 7	10
15	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 00 min 40 sec /	5 7	12
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 00 min 50 sec /	5 7	12
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 10 sec /	5 7	12
16	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 01 min 40 sec /	5 7	12
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec 02 min 00 sec /	3 7	10
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 20 sec 01 min 20 sec /	5 7	12
17	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec / /	3	3
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec / /	3	3
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec / /	3	3
	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 40 sec / /	3	3

18	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	01 min 00 sec / /	3	3
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 47 sec / /	3	3
19	E1	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 30 sec 01 min 50 sec /	5 7	12
	E2	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 25 sec 01 min 00 sec /	5 7	12
	E3	Hyperémie Coagulation Hémorragie	00 min 35 sec 02 min 00 sec /	3 7	10

Les figures 12-13 qui vont suivre montrent la répartition des produits testés selon l'apparition des trois phénomènes étudiés :

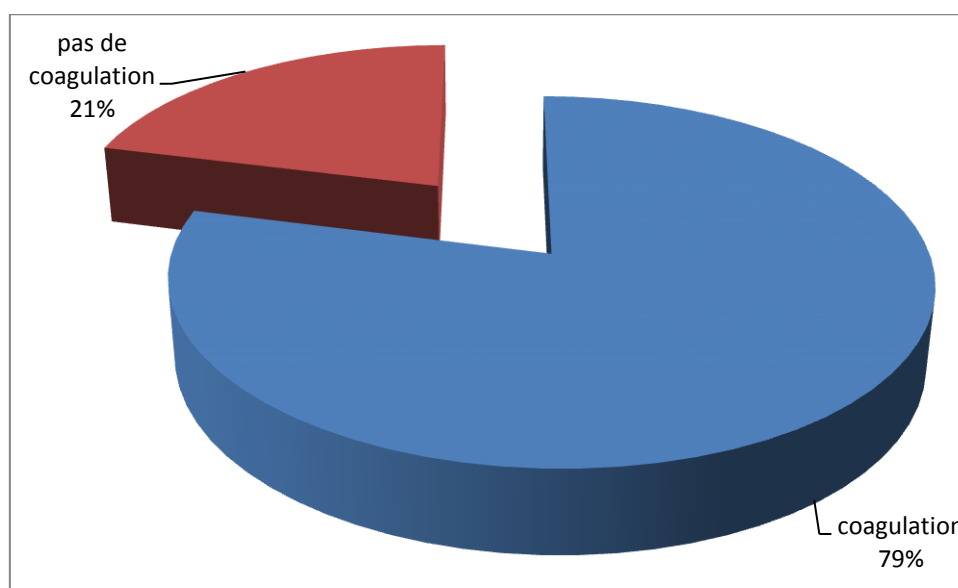


Figure 12 : Répartition des produits cosmétiques testés par le HET-CAM selon le phénomène de coagulation

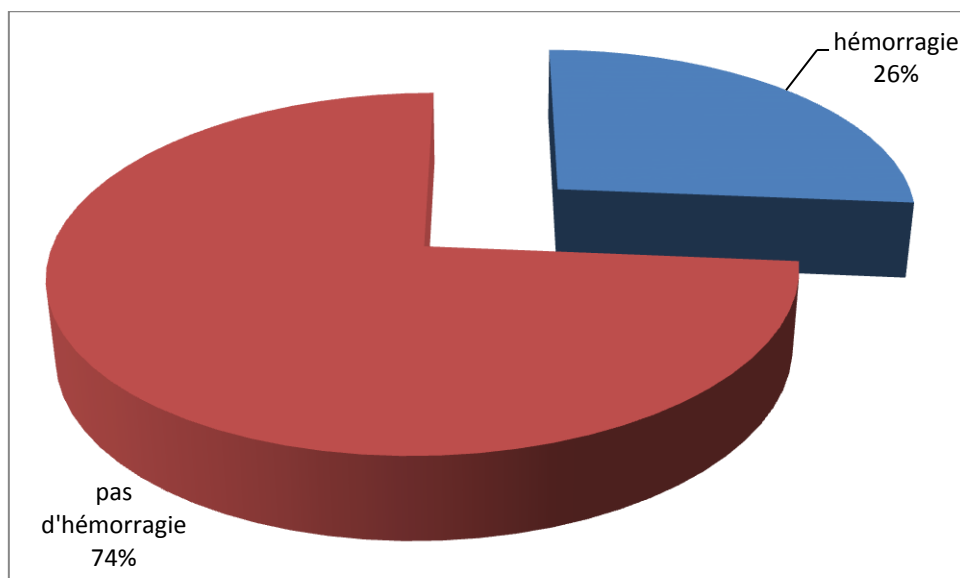


Figure 13 : Répartition des produits cosmétiques testés par le HET-CAM selon le phénomène d'hémorragie

Nous remarquons que le phénomène d'hyperémie est toujours observé, auquel vient s'associer soit une coagulation seule soit une coagulation et une hémorragie.

IV.B- 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 8 : Classification des produits testés selon le potentiel d'irritation

N°	Notation	classification
1	18.33	Irritant
2	11.66	Irritant
3	13.33	Irritant
4	10.33	Irritant
5	12	Irritant
6	16.33	Irritant
7	3	Faiblement irritant
8	3	Faiblement irritant
9	11.33	Irritant
10	12	Irritant
11	12	Irritant
12	12.66	Irritant
13	12	Irritant
14	8.66	Modérément irritant
15	12	Irritant
16	11.33	Irritant
17	3	Faiblement irritant
18	3	Faiblement irritant

Selon les scores obtenus lors du test, on constate que parmi les 19 produits testés :

- 14 sont irritants,
- 01 modérément irritant,
- 04 faiblement irritants,
- aucun produit non irritant.

La figure 14 présente les produits testés selon leur classification :

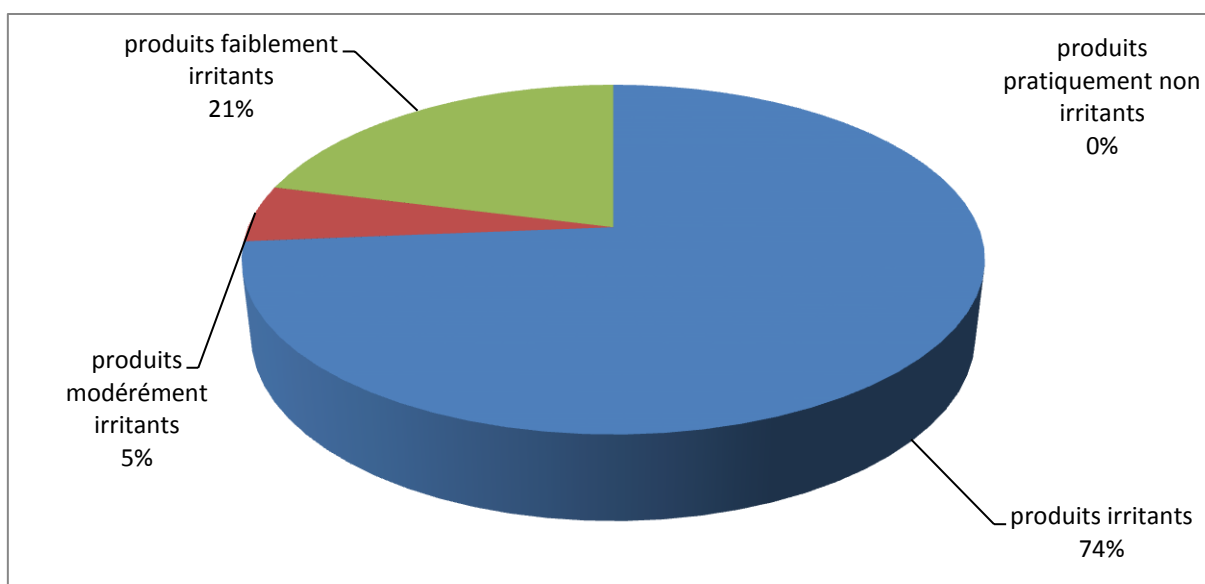


Figure 14 : Répartition des produits testés selon le degré d'irritation

Parmi les 14 produits irritants, 69% sont des produits d'hygiène corporelle et 31% sont des produits de beauté.

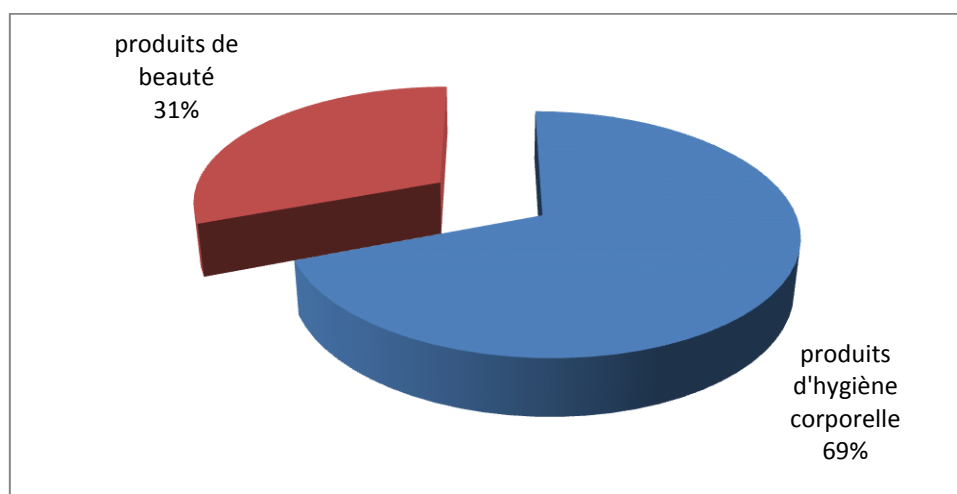


Figure 15 : Répartition des produits irritants selon leur utilisation

❖ produits d'hygiène corporelle :

Les produits d'hygiène corporelle irritants sont répartis selon leur nature comme suit : (figure 16)

- shampoing : 45%
- savon liquide : 11%
- gel douche : 22%
- shampoing 2en1 : 22%

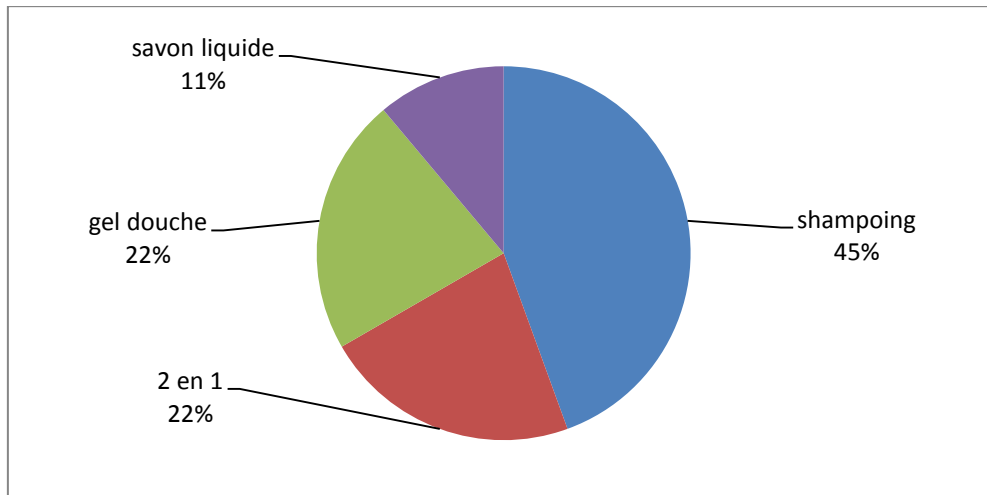


Figure 16 : Répartition des produits d'hygiène corporelle irritants selon leur nature

Nous remarquons que parmi les produits d'hygiène corporelle, seule les après-shampoings sont classés comme faiblement irritants

❖ Produits de beauté :

Les produits de beauté irritants sont répartis selon leur nature comme suit : (figure17)

- Crème de nuit : 20%
- Gommage : 20%
- Nettoyant visage : 60%

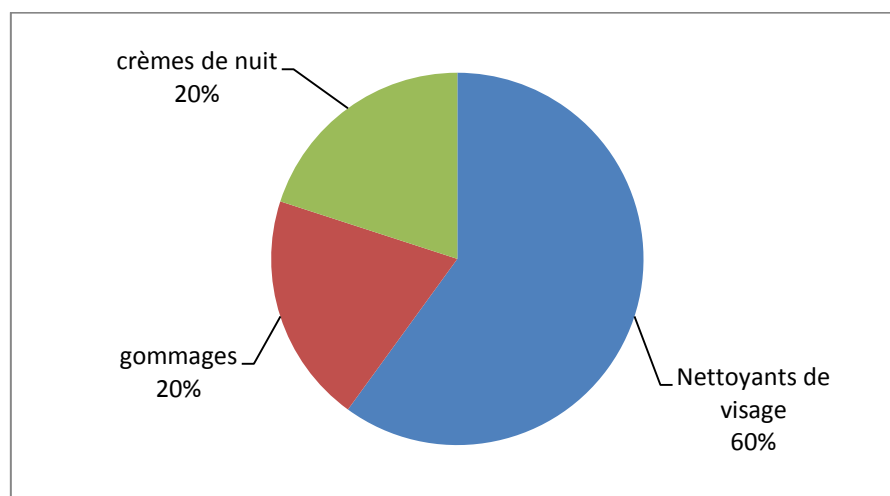


Figure 17 : Répartition des produits de beauté irritants selon leur nature

Nous remarquons que parmi les produits de beauté, seules les crèmes de jour sont classées comme faiblement irritants

IV.C- Étude comparative au test de Draize :

Le tableau ci-dessous représente nos produits testés avec nos résultats du test HET-CAM et d'autres résultats de Draize obtenus par des autres expérimentateurs du CHU constantine sur les mêmes produits.

Tableau 9: Classification des produits testés dans le test HET-CAM et le test de Draize

N°	nature	Résultat HET-CAM	Résultats DRAIZE
1	Shampoing	Irritant	Modérément irritant
2	Shampoing	Irritant	Non Irritant
3	Shampoing	Irritant	Irritant
4	Shampoing	Irritant	Faiblement irritant
5	Shampoing deux en un	Irritant	Irritant
6	Shampoing deux en un	Irritant	Faiblement irritant
7	Après shampoing	Faiblement irritant	Non Irritant
8	Après shampoing	Faiblement irritant	Non Irritant
9	Gel Douche	Irritant	Irritant
10	Gel Douche	Irritant	Irritant
11	Savon liquide	Irritant	Irritant
12	Nettoyant de visage	Irritant	Non Irritant
13	Nettoyant de visage	Irritant	Non Irritant
14	Nettoyant de visage	Modérément irritant	Non Irritant
15	Nettoyant de visage	Irritant	Non Irritant
16	Gommage	Irritant	Non Irritant
17	Crème de jour	Faiblement irritant	Non Irritant
18	Crème de jour	Faiblement irritant	Non Irritant
19	Crème de nuit	Irritant	Non Irritant

Dans les 19 produits testés on à 8 produits donnent une conformité avec le test de Draize sur animaux.

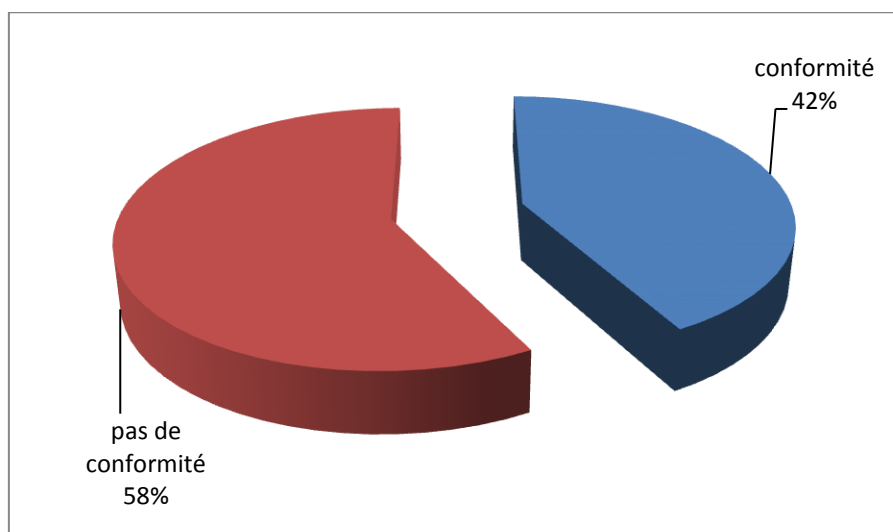


Figure 18 : Répartition des produits testés avec une conformité au test de Draize

Parmi les 19 produits testés on à 6 produits irritants dans le test HET-CAM et ne sont pas irritants dans le test de Draize (résultats négatifs au test du Draize)

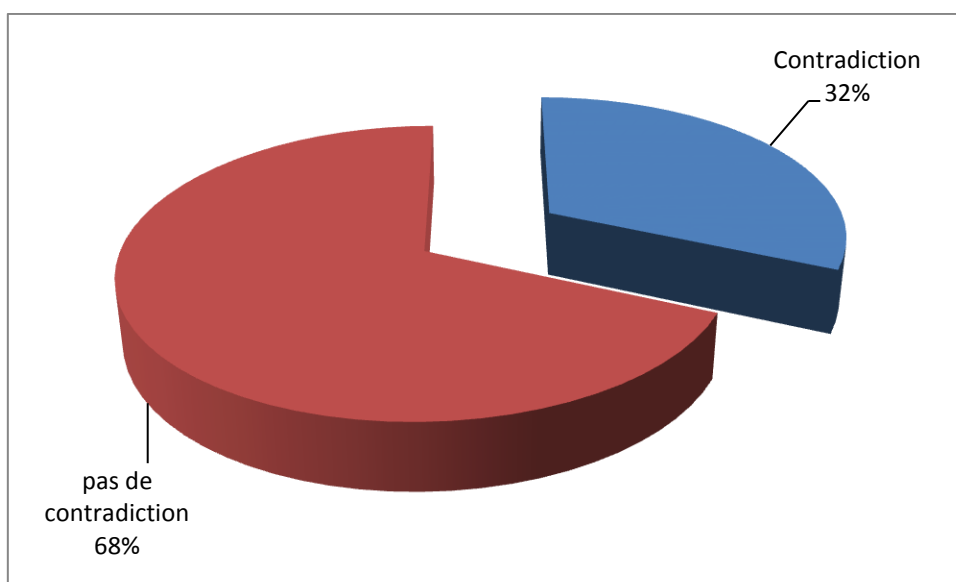


Figure 19 : Répartition des produits testés avec contradiction au test de Draize

Dans les 19 produits testés on à 5 produits donnent des résultats différents en comparaison par les résultats obtenus dans le test de Draize.

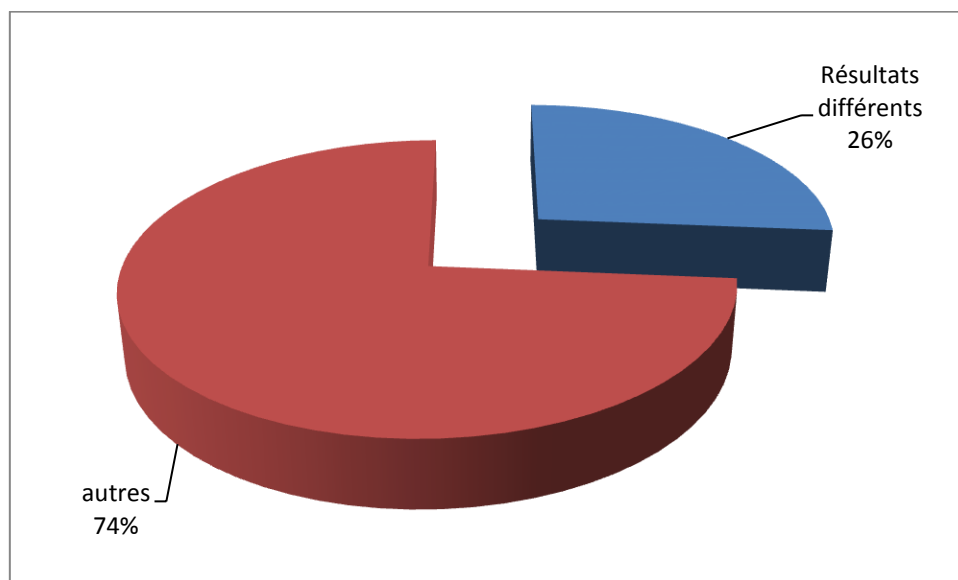


Figure 20 : Répartition des produits testés avec des résultats différents au test de Draize

V-Discussion

Les tests in vitro sont de plus en plus controversés en raison de la souffrance imposée aux animaux. C'est pour cela que des méthodes alternatives fondées sur une science plus rigoureuse ont été mises au point remplaçant ainsi les tests sur les animaux. Le test HET-CAM est une de ces méthodes.

Dans les conditions expérimentales retenues, nous avons évalué le potentiel d'irritation oculaire de 19 produits cosmétiques avec l'utilisation de ce test.

Nous avons calculé pour chaque produit l'indice d'irritation oculaire et selon cet indice nous avons classé nos dix-neufs produits en :

- Produits irritants (74%).
- Produits modérément irritants (5%).
- Produits faiblement irritants (21%).

La majorité des produits cosmétiques testés se sont révélés irritants (74%) alors qu'aucun d'entre eux n'a été classé comme non irritant.

Pour les produits irritants, nous remarquons qu'ils sont en majorité des produits d'hygiène corporelle avec un pourcentage de 69% par rapport aux produits de beauté qui représente quant à eux 31%.

Parmi les produits d'hygiène corporelle irritants, nous avons 45 % de shampoings, et 22 % de shampoings 2en1, les après-shampoings quant à eux se sont révélés faiblement irritants, ce qui nous amène à dire que pour les 22% de produits 2en1 testés c'est le composant shampoing qui est responsable de l'irritation observée.

Pour les produits de beauté irritants (60%) sont des nettoyants de visage (20%) des produits de gommage (20%) des crèmes de nuit, et seules les crèmes de jour se sont révélées faiblement irritantes.

L'étude de la composition des produits d'hygiène identifiés comme irritant par le test HET-CAM montre que ces derniers sont à base d'agents actifs ayant un potentiel irritant plus ou moins prononcé. Il s'agit notamment des tensio-actifs **moussants et nettoyants** d'origine synthétique qui constituent la base lavante des diverses formulations des produits de soin pour le corps et pour les cheveux (shampoing, gel douche, savon liquide, nettoyant visage).

De leur côté les après-shampoings comportent dans leur composition, une phase aqueuse, une phase grasse, et des agents actifs (tel que : diverses protéines, des huiles végétales, des provitamines...). Ces derniers se retrouvent moins concentrés par dilution dans la phase aqueuse qui est plus abondante dans les après shampoings, ce qui leur confère un pouvoir faiblement irritant.

Concernant les produits de beauté, nous avons testé 2 types de crèmes pour visage et un produit de gommage. Pour les crèmes de visage nous avons trouvé que les crèmes de nuit étaient plus irritantes que celle de jour, nous pouvons expliquer ce résultat par rapport à la différence de texture des deux crèmes, en effet la crème de jour ayant une texture plus légère (car moins grasse) que la crème de nuit (qui est plus lourde,) causerait moins de dommages à la CAM (membrane chorio-allantoïdienne) et de ce fait donnerait un effet moins irritant sur cette dernière.

Pour les produits de gommage qui sont des agents servant à éliminer les cellules mortes de l'épiderme, ils sont composés d'une crème hydratante et d'ingrédients exfoliants : petits grains (pour une exfoliation mécanique) et/ou certaines molécules comme les acides de fruits (pour une exfoliation chimique). La présence de ces éléments expliquerait le résultat que nous avons trouvé : le produit de gommage testé s'est révélé irritant.

Les résultats ainsi obtenus montrent que le test HET-CAM aura tendance à donner plus de résultats faussement positifs que faussement négatifs, et de ce fait il peut surestimer le potentiel irritant d'un produit mais jamais le sous-estimer, ce qui en terme de sécurité de l'utilisateur est une garantie de fiabilité.

Pour confirmer l'efficacité de ce test on a comparé ces résultats avec ceux du test Draize oculaire et on a trouvé qu'il y a 42% de concordance entre les deux méthodes c'est-à-dire que huit produits sur dix-neuf ont le même résultat qu'il soit positif ou négatif.

Parmi ces dix-neuf produits on a cinq donnent des résultats différents que les résultats obtenus pour le test de Draize.

Nous avons observé que sur les dix-neuf produits testés, 32% des produits ont donné un résultat positif par le HET-CAM, alors qu'ils ont donné un résultat négatif avec le Draize oculaire. Ceci montre une aptitude et une sensibilité plus grande du test HET-CAM, à identifier le pouvoir irritant d'un produit par rapport au test de Draize oculaire.

La sensibilité du HET-CAM est due à une exposition directe de la membrane chorio-allantoïdienne au produit et plus exactement à un contact direct du produit à tester avec les vaisseaux.

Enfin, au vue de nos résultats nous pouvons établir l'aptitude du test HET-CAM pour dépister les produits cosmétiques irritants avec une bonne sensibilité par rapport aux tests sur animaux dont il constitue une excellente méthode alternative.

Conclusion

La validité des tests pratiqués sur les animaux, en tant que procédures scientifiques visant à prédire les réactions de l'organisme humain, est largement remise en cause, et c'est par la force de l'habitude et par convention que ces pratiques se poursuivent, plutôt que parce que l'on croit à leur fiabilité. Il serait essentiel d'orienter le financement et le savoir-faire vers le développement et la validation de nouvelles méthodes de tests ne faisant pas souffrir les animaux.

Il se trouve aussi que les résultats de ces tests ne sont souvent pas applicables à l'être humain, en raison des différences entre les espèces et parce que ce test est mal conçu. Cela signifie que la sécurité des consommateurs peut se trouver compromise par certains ingrédients de produit cosmétique qui semblent sans risque lorsqu'ils sont testés sur des animaux comme les rats, les souris, ou les lapins.

C'est pour ces raisons que les scientifiques ont opté pour développer d'autres méthodes plus représentatives des risques des produits cosmétiques et plus respectueuses des animaux.

Il existe deux utilisations majeures des méthodes alternatives qui correspondent aux domaines d'utilisation de l'expérimentation animale, mais qui ne sont pas soumises aux mêmes contraintes :

- La recherche fondamentale développe et utilise les outils alternatifs pour la compréhension du fonctionnement de base des cellules en biologie cellulaire et moléculaire ainsi qu'en complément de l'expérimentation animale pour l'étude des mécanismes biologiques intègres.
- Les études effectuées dans un contexte réglementaire ont pour objet de donner des réponses ciblées à des questions restreintes pour la toxicité d'une substance ou contrôle d'un lot de vaccin. Dans ce domaine, la validation est très contraignante dans la mesure où une méthode recevable par les autorités réglementaires doit être validée afin d'apporter la preuve de sa pertinence, de sa capacité à détecter les effets observés chez l'animal ou chez l'Homme et de sa reproductibilité.

Parmi ces méthodes alternatives nous avons choisi le test de HET-CAM pour l'évaluation du potentiel irritant des produits cosmétiques.

Si les études sont conduites dans le strict respect des recommandations

- Il est possible d'analyser sereinement les données obtenues.
- De réfléchir.
- D'évaluer la réalité du risque sans contraintes, en toute indépendance et excellence.

Il est recommandé de réaliser initialement des tests in vitro pour le contrôle des produits cosmétiques avant de passer à l'étude sur les animaux.

On constate donc que cette méthode est plus humanitaire, respecte l'éthique et met en évidence la règle des 3R :

Réduire

Il s'agit de réduire au maximum le nombre d'animaux entrant dans chaque protocole de recherche.

Raffiner

C'est-à-dire éviter la souffrance des animaux en développant des protocoles non invasifs et en systématisant le recours aux analgésiques.

Remplacer

Remplacer l'expérimentation animale chaque fois que d'autres techniques permettent d'atteindre un même résultat. Sur ce point, la recherche a beaucoup évolué et utilise de plus en plus les outils de la génomique pour travailler à partir de modèles cellulaires. Il reste toutefois illusoire de penser que nous pourrions nous passer rapidement des modèles animaux, car la physiologie humaine est complexe.

Si l'approche in vitro ne peut remplacer l'organisme entier, compte tenu de l'isolement des cellules étudiées de leur contexte physiologique, elle est particulièrement utile, comme méthode complémentaire à d'autres types de tests, pour identifier un mécanisme de toxicité relié à un récepteur cible.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CSST. Notion de toxicologie. 2005.
- [2] VIAU C, TARDIF R. toxicologie d'environnement et santé publique-fondements et pratiques. 2003, pp 119-143
- [3] INERIS. Méthodes alternatives en expérimentation animale. Aurélie PREVOT .2011, p 3
- [4] Groupement d'intérêt scientifique. Etat des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale. Francopa. 2010, p18 – 22
- [5] FRANK C .Toxicologie: données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Masson, 1991
- [6] OCDE. Toxicité Cutanée Aiguë n° 402, 1987
- [7] OCDE .Effet irritant/corrosif aigue sur les yeux n° 405, 2012
- [8] OCDE. Études de toxicité chronique n°452, 2009
- [9] CLAIRE BEAUSOLEIL. Anses34. Unité Toxicologie / Direction Santé Environnement Travail. 2011
- [10] OCDE. Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères. n°475.1997
- [11] OCDE. Le test de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifère n°474.1997
- [12] OCDE. Études de cancérogénèse. n°451 .2009
- [13] site wap INSERM. Expérimentation animale, La règle des 3 R. réduire, raffiné, remplacer

[14] OCDE. Test Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué. n° 439 .2013

[15] OCDE. Test de phototoxicité .ocde n°432. 2004

[16] Arrêté du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques

[17] OCDE. Test sur œil de poulet isolé (opi). n°438 .2013

[18] OCDE. Test de mutation reverse sur bactéries. n° 471. 1997

[19] OCDE. Test de mutation génique sur cellules de mammifère. n°476.1997

[20] OCDE .Synthèse Non Programmée de l'ADN (UDS) sur Cellules de Mammifère - *in vitro* ».n°482. 1986

[21] OCDE .Essai in vitro d'Échange de Chromatides-sœurs sur Cellules de Mammifère». n°479.1986

[22] OCDE. Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères. n° LD 473.2014

[23] OCDE. Test du micronoyau in vitro sur cellules de mammifères, n°LD 487.2014

[24] FARDEL O et al. Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets. record.2009.p 80-81.

[25] COMBRIER E, ADOLPHE M. Etude de différents modèles in vitro pour l'évaluation de la tolérance oculaire de formulations cosmétiques. Travaux Universitaires - Thèse nouveau doctorat. (1995)

[26] BAGLEY DM, WATERS D, KONG BM. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. Food Chem. Toxicol. (1994). p 32, 1155-1160.

[27] BALLS M, BOTHAM PA, BRUNER LH, SPIELMANN H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicol in Vitro. (1995) p 9, 871-929.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

La législation européenne et les principaux acteurs dans le domaine des tests de produits cosmétiques

Au sein de l'Union européenne, certaines catégories d'ingrédients sont spécifiquement réglementées par la Directive sur les produits chimiques. Il s'agit notamment des ingrédients qui sont potentiellement dangereux et qui ne sont autorisés qu'avec des restrictions : conservateurs, colorants et filtres à ultraviolets.

Une grande partie des tests auxquels sont soumises les substances chimiques sont réalisées sur des animaux. L'objectif de ces tests est de repérer les dangers qu'une substance peut représenter pour la santé, pour que ces substances chimiques puissent être classées, étiquetées, manipulées et utilisées en tenant compte des risques et des dangers. [4]

I- La Commission européenne:

Plusieurs directions générales (DG) de la Commission sont concernées par la production, l'évaluation de l'innocuité et la commercialisation des produits chimiques au sein de l'Union européenne :

La DG Recherche développe la politique de l'Union européenne en matière de recherche et de technologie, et s'occupe du développement de nouvelles méthodes de tests pour l'évaluation des risques et des questions d'innocuité concernant les nouveaux produits chimiques. [4]

II- Le SCCNFP:

Le Comité scientifique pour les produits cosmétiques et les produits non alimentaires (SCCNFP) assiste la Commission européenne dans l'étude des problèmes scientifiques et techniques liés à l'évaluation de l'innocuité des produits chimiques et articles de toilette. [4]

III- L'ECVAM:

Le Centre européen pour la validation des méthodes substitutives (ECVAM) fait partie du Centre commun de recherches de la Commission européenne à Ispra, en Italie. Le rôle de l'ECVAM est de superviser et /ou de mener des études de validation des méthodes destinées à remplacer ou à permettre de limiter les tests sur les animaux, pour les produits de consommation courante comme pour les produits pharmaceutiques. [4]

IV- L'OCDE:

L'instance internationale qui produit les directives de tests officiellement reconnues pour les substances chimiques est l'Organisation de coopération et de développement économique (OCDE). L'OCDE intervient aussi comme conseil sur certaines questions, par exemple la manière dont les études de validation des nouvelles méthodes de tests doivent être menées. [4]

V - Le Parlement européenne:

Le Parlement européen a cherché à fixer une date butoir au-delà de laquelle les nouveaux produits chimiques commercialisés dans l'Union européenne ne pourraient plus avoir été testés sur des animaux, que ce soit sous forme d'ingrédients ou sous forme de produits finis. Cette échéance aurait permis de hâter le développement et la validation des méthodes substitutives.

Parlement demandant que l'interdiction entre en vigueur sans considération de la disponibilité des méthodes de remplacement. Comme le Parlement s'en tenait à ce principe avec fermeté, le Conseil des ministres a dû parvenir à une décision unanime. [4]

ANNEXE 2 :

Arrêté du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques

METHODE OFFICIELLE D'EVALUATION DU POTENTIEL IRRITANT PAR APPLICATION SUR LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE DE L'OEUF DE POULE

I. Objectif et principe

Cette méthode est une alternative à l'expérimentation animale pour l'évaluation du potentiel irritant des produits cosmétiques.

Le principe en est basé sur l'observation, par une personne entraînée, des effets irritants (hyperémie, hémorragie, coagulation) pouvant survenir dans les cinq minutes suivant le dépôt d'un produit sur la membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'œuf de poule embryonné, au dixième jour d'incubation.

Dans le cas des produits cosmétiques, notamment à base de tensioactifs, cette méthode est applicable à l'évaluation du potentiel irritant oculaire.[16]

II. Matériel (liste indicative)

Œufs de poule embryonnés (la souche White Leghorn est recommandée), d'un poids compris entre 50 et 65 g le jour de la réception.

Enceinte thermostatée.

Incubateur à œufs.

Lampe à mirer les œufs.

Pince anatomique droite (pince à disséquer, brucelles, ...) à bouts mousse et sans mors.

Ciseaux à bouts ronds.

Bain thermostaté à 37°C.

Chronomètre.

Pipettes, tubes à essai, béchers...

Seringues de 1 ml à 5 ml.

Balance de précision.

Soluté injectable de pentobarbital.

Eau pour préparations injectables.

Soluté isotonique de Na Cl à 0,9 p. 100.

III. Protocole expérimental

A. Réception des œufs

Dès réception, les œufs fêlés ou cassés sont éliminés. Les autres sont conservés à l'abri de la lumière et à une température de 1°C à 12°C (enceinte ou local adapté) pendant au moins vingt-quatre heures avant de les placer en couveuse.

B. Mise en couveuse

Les œufs sont pesés et identifiés puis placés dans l'incubateur (température optimale : 37,8°C, humidité comprise entre 50 et 60 p. 100). Si l'incubateur n'est pas équipé d'un système de retournement automatique, les œufs doivent être retournés manuellement au moins deux fois par jour.

Pendant toute la durée de l'incubation, la température et l'humidité sont contrôlées et réglées si nécessaire.

Les œufs sont placés en position verticale (poche d'air vers le haut) dès le début dans le cas d'incubateurs équipés de plateaux oscillants et au huitième jour d'incubation dans les autres cas.

C. Vérification des œufs

Au dixième jour d'incubation, les œufs sont mirés et les œufs défectueux sont rejetés.

D. Essai proprement dit

Les différentes étapes de l'essai sont enchaînées rapidement sous un éclairage d'une intensité suffisante ne dégageant pas de chaleur afin de ne pas dessécher la MCA. Dans le cas contraire, l'atmosphère est humidifiée à l'aide, par exemple, d'un brumisateur. 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. A 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.

Toute la surface de la membrane coquillière est alors humidifiée avec du soluté isotonique de chlorure de sodium tiédi à 37°C. Le soluté est ensuite éliminé par inclinaison de l'œuf. Avec une pince la membrane coquillière est décollée délicatement puis retirée afin de découvrir la membrane chorio-allantoïdienne sous-jacente. Tout œuf dont la membrane chorio-allantoïdienne est défectueuse ou présente des traces d'hémorragie est rejeté. 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 et le chronomètre est aussitôt 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. L'effet irritant du produit à l'essai (ou de chacune de ses dilutions) est évalué sur quatre œufs. En fin d'essai, les œufs reçoivent une injection de pentobarbital puis sont éliminés. [16]

E. Procédure de 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.

1. 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.

2. 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.

3. Coagulation (opacité et/ou thrombose)

Opacité :

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, ...).

Thrombose :

Phénomène observé : rupture du flux sanguin dans les vaisseaux se traduisant par un aspect segmenté (alternance d'étranglements et de zones turgescents plus ou moins sombres). Il est à noter que les observations ne doivent pas prendre en compte les modifications intervenues au niveau des capillaires. [16]

F. Résultats

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

Notation en fonction du temps

Phénomène	Temps	Score
Hyperémie	t inférieure ou égal à 30 s	5
	t supérieure à 30 s et inférieur 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 inférieur 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 inférieur ou égal à 2 min	7
	t supérieure à 2 min et inférieure ou égale à 5 min	5

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 quatre œufs. La notation maximum est 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 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.

❖ Remarques importantes

Il est à noter que la reproductibilité des résultats est d'autant meilleure que la personne réalisant l'essai est entraînée et que les conditions expérimentales sont respectées. De manière à vérifier la qualité des conditions opératoires et celle des expérimentateurs, il est conseillé de procéder régulièrement à des contrôles à l'aide d'une référence. A cet effet, l'établissement préalable d'une courbe étalon avec des solutions aqueuses à 0,05 p. 100 - 0,4 p. 100 et 3,2 p. 100 (m/v) de lauryl sulfobétaïne est recommandé. L'expérimentateur appréciera le potentiel irritant du produit à l'essai par comparaison aux données acquises pour des produits de même catégorie. Le rapport d'essai doit comporter toutes les indications prévues par les règles de bonne pratique de laboratoire.

Année universitaire :
2014/2015

Présenté par : BOUGHEDDA oualid
BENDJABER moussa

Place des tests in vitro en toxicologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de master en biologie animale

Option : Toxicologie et Santé

ملخص:

التجارب في المختبر هي غالبية الطرق البديلة التي وضعت كبديل للتجارب على الحيوانات، وذلك من حيث التكلفة و الأداء (منخفضة التكلفة، السرعة) التي يجعل منها أداة مناسبة خاصة لفحص عدد كبير من الجزيئات الكيميائية، للحصول على معلومات عن سميتها.

إن تطوير الطرق البديلة في التجارب على الحيوانات تهدف إلى جميع الاستخدامات، و يؤدي تجميعها مع بعضها البعض، إلى تحسين قدرة التعرف على السموم .

نحن نستهلك المزيد والمزيد من أنواع مختلفة من المنتجات يوميا ، و نحن لا نعرف معظم مكوناتها التي يمكن احتمالها أن تكون سامة.

عندما يتم وضع منتجات التجميل في السوق، لا بد أن لا تقدم أي خطر على المستهلك في ظل الظروف الطبيعية للاستخدام أو ظروف الاستخدام الغير طبيعية ولكن يمكن التنبؤ بهذا الخطر.

يتم تقييم سلامة منتجات التجميل بواسطة اختبارات على المكونات من جهة، ومن جهة على خليط هذه المكونات، التي أنشأها المختصون في مجال منتجات التجميل.

في عملنا المقدم ، قمنا بتقييم إمكانية تهيج العين من بعض منتجات التجميل من خلال تجربة في المختبر in vitro ، تجربة HET-CAM و مقارنة نتائج هذه التجربة مع نتائج تجربة Draize على مستوى العين وهي تجربة تتم على الكائن الحي in vivo وأيضا تقييم قدرة تجربة HET-CAM على أن تحل محل الاختبارات على الكائن الحي in vivo و صقل النتائج عن طريق الحد من التجارب على الحيوانات .

الكلمات المفتاحية: التجارب على الحيوانات ، الاختبار على جسم الكائن الحي (in vivo) ، الاختبار في المختبر (in vitro) ، اختبار HET-CAM ، مدى تهيج ، منتجات التجميل

Structures de recherche : Service de toxicologie, CHU Constantine

Année universitaire : 2014/2015

Présenté par : BOUGHEDDA oualid

BENDJABER moussa

Place des tests in vitro en toxicologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de master en biologie animale

Option : Toxicologie et Santé

Abstract:

In vitro methods are the majority of methods developed as alternatives to animal experimentation in addition their cost / performance (low cost, speed) make it a particularly suitable tool for screening a large number of chemical molecules, to obtain information on their toxicity.

The development of alternative methods in animal experimentation must therefore aim all uses lead to methods combined with each other, can improve the predictive power of toxicology.

We consume more and more different types of products every day, however, we do not know most about their components that can be potentially toxic.

When a cosmetic product is placed on the market, it is essential to know that there is no danger for the consumer under normal conditions of employment or under exceptional conditions but predictable.

The safety of cosmetic products is assessed through tests conducted firstly on ingredients, and also their mixture formulated by the cosmetologist.

In our work , we evaluated the ocular irritation potential of certain cosmetic products by a method in vitro HET-CAM test, and compared the results of this test with the results of an in vivo eye test method for Draize assessed the HET-CAM test 's ability to replace in vivo testing that refined the results and reduce animal testing.

Keywords : Animal experimentation, in vivo tests, in vitro tests, HET-CAM test, irritation potential , cosmetic product

Structures de recherche : Service de toxicologie, CHU Constantine

Année universitaire : 2014/2015

Présenté par : BOUGHEDDA oualid

BENDJABER moussa

Place des tests in vitro en toxicologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de master en biologie animale

Option : Toxicologie et Santé

Résumé

Les méthodes in vitro forment la majorité des méthodes de remplacement développées comme alternatives en expérimentation animale par ailleurs, leur rapport coût/performance (faible coût, rapidité) en fait un outil particulièrement adapté au criblage d'un grand nombre de molécules chimiques, afin d'obtenir des informations sur leur toxicité.

Le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale doit donc viser l'ensemble des usages et aboutir à des méthodes qui combinées les unes avec les autres, permettent d'améliorer le pouvoir prédictif de la toxicologie.

Nous consommons de plus en plus différents types de produits de manière quotidienne cependant nous ignorons la plupart de leurs constituants qui peuvent être potentiellement toxiques.

Lorsqu'un produit cosmétique est mis sur le marché, il est absolument indispensable qu'il ne présente aucun danger pour le consommateur dans les conditions normales d'emploi ou dans des conditions d'emplois inhabituelles, mais prévisibles.

La sécurité des produits cosmétiques est évaluée au moyen des tests effectués d'une part sur les ingrédients, et d'autre part sur leur mélange formulé par le cosmétologue.

Dans notre travail, nous avons évalué le pouvoir d'irritation oculaire de certains produits cosmétiques par une méthode in vitro, le test HET-CAM, et comparé les résultats de ce test avec des résultats d'une méthode in vivo, le test de Draize oculaire afin d'évaluer la capacité du HET-CAM à remplacer le test in vivo et raffiner les résultats obtenus en réduisant l'expérimentation sur les animaux.

Mots clé : Expérimentation animale, tests in vivo, tests in vitro, test HET-CAM, pouvoir irritant, produits cosmétiques

Structures de recherche : Service de toxicologie, CHU Constantine