

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
بيولوجيا الحيوانات قسم
Département de Biologie Animale

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

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

Étude de la toxicité locale in vitro : Het-Cam Test

Présenté par DJADAOUN Bouthaina
MEGUELLATI Aya
NASRI Fatima Zohra

Le 21/06/2023

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr ZAAMA Djamila (Prof – Université des Frères Mentouri, Constantine 1).
Encadrant : Dr TEHAMI Soumia (MAHU- Université Salah Bounider, Constantine 3).
Examineur : Dr MOURI Fouzia (MCB- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2022- 2023

Remerciement

APRÈS AVOIR RENDU GRÂCE À ALLAH LE TOUT PUISSANT ET LE
MISÉRICORDIEUX,

NOUS TENONS À REMERCIER :

MME TEHAMI SOUMIA, QUI A SUPERVISÉ NOTRE TRAVAIL AVEC
PATIENCE, EXPERTISE ET ENGAGEMENT. VOTRE ENCADREMENT,
VOS ENCOURAGEMENTS ET VOS SUGGESTIONS ONT ÉTÉ ESSENTIELS
POUR MENER À BIEN CE PROJET.

LES JURÉS QUI NOUS FONT HONNEUR D'EXAMINER CE TRAVAIL MME
ZAAMA ET MME MOURI

NOTRE FAMILLE A ÉTÉ D'UN GRAND SOUTIEN TOUT AU LONG DE NOS
ÉTUDES

MERCI AUX CHERCHEURS POUR LEURS CONSEILS ET LEUR AIDE
FAIRE LE TRAVAIL.

Dédicace

TOUT D'ABORD, JE VOUDRAIS REMERCIER DIEU DE M'AVOIR DONNÉ LA FORCE ET LE COURAGE DE BIEN FAIRE CET HUMBLE TRAVAIL.

JE VOUDRAIS DÉDIER CET HUMBLE TRAVAIL ET DÉDIER MON DIPLOME À CELUI QUI A RÉCOLTÉ DES ÉPINES SUR MON CHEMIN POUR OUVRIR LA VOIE DE LA CONNAISSANCE À LA PERSONNE LA PLUS MERVEILLEUSE DE MON CHER PÈRE DJADAOUN KHALED.

À LA FONTAINE DE TENDRESSE ET DE FOI DÉBORDANTE QUI M'ANCRAIT DANS MA FAIBLESSE, MA MÈRE BOUTEHOULA SOUAD.

À MES FRÈRES WÆEL, OUSSAMA, DHIYAA ET À TOUS MES MOMENTS D'ENFANCE AVEC EUX EN SIGNE DE MA PROFONDE GRATITUDE POUR L'AIDE QU'ILS M'ONT APPORTÉE.

AUX COMPAGNONS DES ANNÉES, ET SUR LE TÉMOIGNAGE DE L'AMITIÉ QUI NOUS UNIT, JE DÉDIE CE TRAVAIL À TOUS CEUX QUI M'ONT SOUTENU DANS CE CHEMINEMENT.

Bouthiana

Dédicace

JE DÉDIE CE TRAVAIL À ...
MON PÈRE AOUMAR...

AUCUNE DÉDICACE NE SAURAIT EXPRIMER L'AMOUR, L'ESTIME, LE
DÉVOUEMENT ET LE RESPECT QUE J'AI TOUJOURS EN POUR VOUS.
RIEN AU MONDE NE VAUT LES EFFORTS FOURNIS JOUR ET NUIT POUR
MON ÉDUCATION ET MON BIEN ÊTRE.

CE TRAVAIL EST LE FRUIT DE TES SACRIFICES QUE TU AS
CONSENTIS POUR MON ÉDUCATION ET MA FORMATION.

À MA TRÈS CHÈRE MÈRE SAMIA...

AFFABLE, HONORABLE, AIMABLE : TU REPRÉSENTES POUR MOI LE
SYMBOLE DE LA BONTÉ PAR EXCELLENCE, LA SOURCE DE
TENDRESSE ET L'EXEMPLE DU DÉVOUEMENT QUI N'A PAS CESSÉ DE
M'ENCOURAGER ET DE PRIER POUR MOI.

À MES CHÈRES SŒURS ROMAÏSSA, NARDJES, AMIRA, KHADIDJA
À MES DEUX BEAUX PETITS ENFANTS ABD EL SAMED ET YUCEF
À TOUS LES MEMBRES DE MA FAMILLE, PETITS ET GRANDS...

À MON ONCLE AL-KHAMISI ET MA TANTE LAMIA DÉCÉDÉS, QUE LA
MISÉRICORDE D'ALLAH SOIT SUR EUX. QUE LEURS CŒURS, QUI
PORTAIENT TOUT L'AMOUR ET LA TENDRESSE, SOIENT BÉNIS.

EN TÉMOIGNAGE DES SOUVENIRS DE TOUS LES MOMENTS QUE NOUS
AVONS PASSÉ ENSEMBLE, JE VOUS DÉDIE CE TRAVAIL ET JE VOUS
SOUHAITE UNE VIE PLAINÉ DE SANTÉ ET DE BONHEUR.

Fatima el Zahra

Dédicace

MON DIEU, LES MOMENTS NE SONT AGRÉABLES QU'EN SE
SOUVENANT DE TOI ET EN TE REMERCIANT, ET LE PARADIS N'EST
AGRÉABLE QU'EN TE VOYANT. LE VOYAGE N'A PAS ÉTÉ COURT ET
NE DEVRAIT PAS L'ÊTRE. LE RÊVE N'ÉTAIT PAS PROCHE, NI LA
ROUTE PLEINE DE FACILITÉS, MAIS JE L'AI FAIT.

JE DÉDIE MA GRADUATION APRÈS LA GRÂCE DE DIEU. CE QUE JE
SUIS EST DÛ À CELUI DONT JE PORTE LE NOM AVEC FIERTÉ, À MON
PÈRE, MEGUELLATI NOUREDDIN.

A LA MAIN INVISIBLE QUI A ENLEVÉ LES ÉPINES DE MON CHEMIN, O
FONTAINE DE TENDRESSE, MA MÈRE DILEKH ZAHIYA.

A MA GRAND-MÈRE DÉCÉDÉE, QUE DIEU AIT PITIÉ D'ELLE, AIT PITIÉ
D'UN CŒUR QUI PORTAIT TOUT AMOUR.

A MES FRÈRES, AUX COMPAGNONS D'ANNÉES, ET À TOUS CEUX QUI
M'ONT AIDÉ ET SOUTENU SUR CE CHEMIN, JE VOUS SUIS
RECONNAISSANT À TOUS, JE NE SERAIS PAS ARRIVÉ SANS VOTRE
GRÂCE APRÈS LA GRÂCE DE DIEU.

AYA

TABLE DE MATIERE

TABLE DE MATIERE

REMERCIEMENT

DEDICACE

INTRODUCTION..... 1

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I : GENERALITE

I. GENERALITE 4

I.1 Latoxicologie 4

I.2 La toxicité 4

I.3 Les différentes formes de toxicité 4

I.3.1 La toxicité aiguë..... 4

I.3.2 Toxicité subaiguë 4

I.3.3 La toxicité chronique 4

I.3.4 La toxicité subchronique..... 4

I.4 Notion d'exposition et d'effet 5

I.4.1 La dose toxique 5

I.4.2 L'effet toxique 5

I.4.3Relation dose effet 5

I.5 La cytotoxicité..... 7

I.6 Evaluation des dangers 8

I.7 Essais de toxicité 8

I.7.1 Les tests de toxicité in vivo..... 8

I.7.2 Les tests de toxicité in vitro 9

I.7.3 La méthode in silico..... 10

I.8 La législation 11

I.8.1 La législation et les principaux acteurs dans le domaine des tests de produits cosmétiques 11

I.8.1.1 Au niveau européen 11

I.8.1.2 Au niveau algérien 11

I.8.2 Les structures institutionnelles encadrant la sécurité d'emploi des cosmétiques . 12

I.8.2.1 Au niveau Européen..... 12

I.8.2.2 Au niveau algérien 13

CHAPITRE II :LES TESTS IN VITRO

II. LES TESTS IN VITRO..... 15

II.1 Méthodes d'évaluation de la toxicité in vitro 15

TABLE DE MATIERE

II.1.1 Réduire.....	15
II.1.2 Raffiner.....	15
II. 1.3 Remplacer.....	16
II.2 Les tests de toxicité locale.....	16
II.2.1. Test d'Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué (OCDE n°439).....	16
II.2.2 Tests d'Eyetex.....	17
II .2.3 Test sur œil de poulet isolé (OPI)(OCDE n° 438).....	17
II.2.4 Test de HET-CAM.....	18
II.2.5 Test de photo toxicité (OCDE n° 432).....	18
II.3 Les tests de toxicité systémique.....	19
II.3.1 Test d'Âmes mutation reverse sur bactéries (OCDE n° 471).....	19
II.3.2 Test de mutation génique sur cellules de mammifère (OCDE n° 476).....	19
II.3.3 Test d'échange de chromatides sœurs (OCDE N° 479).....	20
II.3.4 Test d'aberration chromosomique in vitro sur cellules de mammifère (OCDE N° 473).....	20
II.3.5 Test des comètes (OCDE N° 489).....	21
II. 4 Avantages et limites des méthodes in vitro.....	23
II.4.1 Les Avantages.....	23
II.4.2 Les Limites.....	23
CHAPITRE III :TESTE HET-CAM	
III. HET-CAM TEST.....	25
III.1 Historique.....	25
III.2 Définition.....	26
III.3 Principe de test.....	27
III.4 Objectif de test.....	29
III.5 La membrane chorioallantoïdienne MCA.....	29
III.5.1 Définition.....	29
III.5.2 Les caractéristiques de CAM.....	30
III.6 Avantages et limites de test.....	31
III.6.1 Avantages.....	31
III.6.2 Limites.....	32
PARTIE PRATIQUE	
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODE	
I.1. Matériel.....	36
I.1.1 Réactifs.....	36
I.1.2 Instruments.....	36

TABLE DE MATIERE

I.1.3 Verrerie	36
I.1.4 Œufs de poulet embryonnés.....	36
I.1.5 Produits à tester.....	36
I.2. Méthode	37
I.2.1 Réception des œufs	37
I.2.2 Incubation	37
I.2.3 Préparation des produits à tester	37
I.2.4 Réalisation du test.....	38
I.2.5 Observation des effets.....	38
I.2.6 Mesure des scores d'irritation.....	40
CHAPITRE II : RESULTATS	
II.1 Résultats d'observation.....	43
II.2 Résultats des scores d'irritation.....	46
CHAPITRE III : DISCUSSION	
III.1 Sérum physiologique NaCl 0.9% (témoin négatif)	49
III.2 NaOH (Témoin positif)	50
III.3 Huile essentielle de lavande	52
III.4 Huile essentielle de géranium	54
III.5 Le Teatree	56
III.6 Palmarosa.....	58
III.7 Les polymères d'alginate.....	62
III.8 Triéthylène glycol diméthacrylate (TEGDMA).....	64
III.9 Orthosilicat tétra éthyle (TEOS).....	64
CONCLUSION.....	69
REFERENCES.....	71
RESUME	

LISTE DES ABBREVIATIONS

°C	Degré Celsius.
ADN	Acide désoxyribonucléique
CACQE	Centre Algérienne du Contrôle de la Qualité et de L'emballage
CAM	Membrane Chorioallantoïque.
CCR	Centre Commune de Recherche.
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
g	Gramme.
HE	Huile essentiel.
HET-CAM test	Test hen's egg-chorioallantoic membrane test.
HPRT	Hypo xanthine-guanine phosphoribosyl transférase.
ICCVAM	Comité de Coordination Inter-agences pour la Validation des Méthodes Alternatives.
MAA	Acide méthacrylique.
min	Minute.
ml	Millilitre.
NaCl	Chlorure de sodium.
NaOH	Hydroxyde de sodium.
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques.
ONU	Organisation des Nations Unies.
OPI	Œil de poulet isolé.
s	Seconde.
SCE	Echange de chromatides sœur.
SGH	Système Général Harmonisé.
SiO ₂	Dioxyde de silicium.
TEGDMA	Triéthylène glycol diméthacrylate.
TEOS	Ortho silicate de tétraéthyle.

LISTE DES ABBREVIATIONS

TG	6-thioguanine.
XPRT	Transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase.
μL	Microlitre.

Liste des figures

Figure 01 : Relation entre la dose et l'effet (CSST, 2004).....	6
Figure 02: Relation entre la dose et la réponse (CSST, 2004).	6
Figure 03: Test des comètes (Mr, 2010).....	22
Figure 04: Des phénomènes observés sur la CAM dans le test HET-CAM (I.D.Rupenthal et al, 2011).	28
Figure 05 : La membrane chorioallantoïdienne (CAM) (P.Nowak-Sliwinska et al, 2014).	30

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différents types de toxicité (CSST, 2004)	5
Tableau 02 : Préparation des produits à tester.	37
Tableau 03 : Observation des effets.	38
Tableau 04 : Notation pour les tests des irritations avec la méthode de teste HET-CAM (Spielmann and Liebsch, 2010).....	40
Tableau 05 : Expression des résultats selon la notation (X.Yan et al, 2007).	41
Tableau 06 : Les résultats des produits testé.....	43
Tableau 07 : Présentation des scores finaux selon le degré d'irritation.....	46

Introduction

Introduction

Initialement, les tests de sécurité ne s'appliquaient pas aux produits cosmétiques et aux produits de soins, se sont révélés responsables de plusieurs incidents qualifiés ultérieurement de scandales sanitaires, mettant ainsi en danger la santé de l'utilisateur et de la descendance. La sécurité des produits chimiques, produits cosmétiques et produits finis est une préoccupation majeure dans de nombreux secteurs industriels. L'évaluation des risques liés à la toxicité cutanée, dermique, oculaire et muqueuse est essentielle pour assurer la protection des consommateurs. En général, les nouvelles substances chimiques sont généralement testées pour évaluer leur potentiel d'irritation, en particulier l'irritation oculaire, souvent évaluée à l'aide du test de l'œil de lapin « Draize ». Cependant, en raison des nouvelles lois de protection des animaux, ainsi que des raisons éthiques et économiques, il est nécessaire de développer des méthodes alternatives pour réduire, raffiner et remplacer les expériences sur les animaux.

Plusieurs méthodes alternatives ont été proposées en laboratoire pour remplacer les tests sur les animaux, notamment l'utilisation de systèmes de culture cellulaire et de tissus reconstruits. Parmi ces méthodes, on retrouve l'utilisation de la cornée isolée du lapin, de l'œil de poulet isolé, le test d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine, ainsi que le test de la membrane chorioallantoïdienne du poulet le HETCAM test. Récemment, le test HETCAM est devenu un outil de choix pour évaluer la toxicité des produits chimiques et des produits cosmétiques sur les yeux. Ce test utilise des œufs de poulet fécondés, où les substances chimiques sont appliquées sur la membrane chorioallantoïdienne, qui possède des caractéristiques similaires à l'œil humain. Ce type de test est largement préféré par rapport aux tests sur les animaux en raison de ses nombreux avantages, tels que la rapidité des résultats, sa facilité d'application ne nécessitant pas de compétences spécialisées, ainsi que son coût relativement faible. Le test HET-CAM est reconnu internationalement comme une méthode fiable et précise pour évaluer la toxicité des produits chimiques, et il est intégré aux réglementations de sécurité des produits. Cette étude vise à évaluer la toxicité locale de certains produits. L'objectif de cette expérience est de classer les produits en fonction des résultats d'irritation obtenus grâce au test de toxicité sur un organisme vivant, en comparaison avec les risques de toxicité pour l'homme.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I : GENERALITE

I. GENERALITE

I.1 La toxicologie

La toxicologie a longtemps été considérée comme la science qui étudie les substances toxiques. Elle étudie les effets nocifs des substances chimiques, physiques ou autres sur les organismes vivants. Elle nécessite de nombreuses connaissances scientifiques et s'intéresse à plusieurs domaines de l'activité humaine : agriculture, alimentation, industrie pharmaceutique, environnement, travail (CSST, 2004).

I.2 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 (CSST, 2004).

I.3 Les différentes formes de toxicité

I.3.1 La toxicité aiguë

La toxicité aiguë est une forme de toxicité résultant d'une exposition à court terme à une substance toxique après absorption rapide de doses uniques ou multiples ne dépassant pas 24 heures. Les manifestations cliniques se développent généralement rapidement, sans retard dans la mort ou la guérison (Bensakhria, 2018).

I.3.2 Toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë est une forme d'une exposition répétée du produit toxique pendant une courte durée ne dépasse pas un mois et supérieur à 24 heures (CSST, 2004).

I.3.3 La toxicité chronique

La toxicité chronique regroupe l'ensemble des effets délétères qui touchent un organisme vivant suite à une exposition ou à une administration habituelle d'un toxique à des doses multiples –non létales. Ces doses, individuellement, sont insuffisantes pour provoquer un effet immédiat. L'exposition doit être répétée sur une longue période pour causer des effets néfastes. L'apparition de ces effets est souvent insidieuse de manifestation brutale sans aucun symptôme alarmant, elle peut être réversible ou irréversible (Bensakhria, 2018).

I.3.4 La toxicité subchronique

La toxicité subchronique est le résultat d'une exposition ou une administration réitérée d'un toxique à des doses multiples non létales pendant une durée supérieure à trois mois (CSST, 2004).

Tableau 1 Les différents types de toxicité (CSST, 2004)

Forme d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée de l'exposition
AIGUË	Unique	< 24 heures
SUBAIGUË	Répétée	<= 1 mois
SUBCHRONIQUE	Répétée	de 1 à 3 mois
CHRONIQUE	Répétée	> 3 mois

I.4 Notion d'exposition et d'effet

I.4.1 La dose toxique

Un principe important en toxicologie veut que toutes les substances chimiques soient toxiques, car il existe toujours une dose pouvant causer un effet nocif **(CSST, 2004)**.

I.4.2 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). La notion d'effet toxique suppose des conséquences nocives pour l'organisme **(CSST, 2004)**.

I.4.3 Relation dose effet

La relation dose-effet décrit la relation entre la quantité d'une substance chimique administrée ou exposée à un organisme et la réponse ou l'effet biologique qui en découle. Cette relation permet de comprendre comment la réponse biologique évolue en fonction de la dose de la substance **(Curtis D. Klaassen, 2019)**.

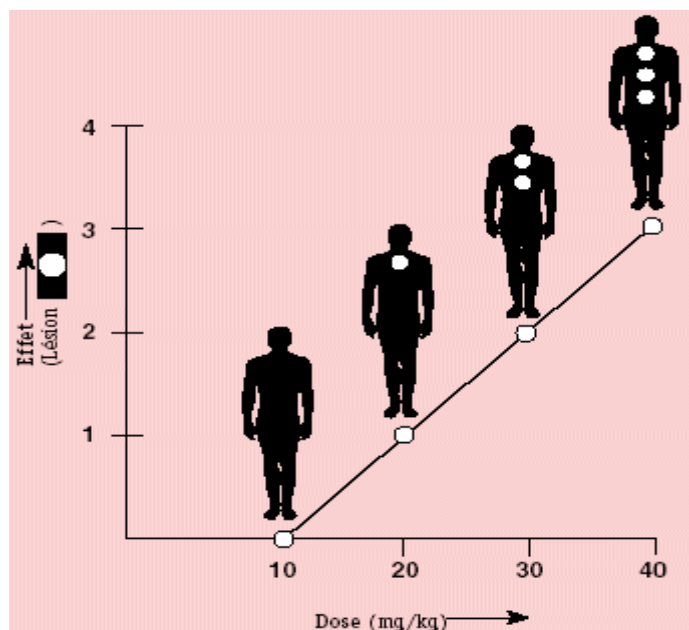


Figure 01 : Relation entre la dose et l'effet (CSST, 2004).

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 (CSST, 2004).

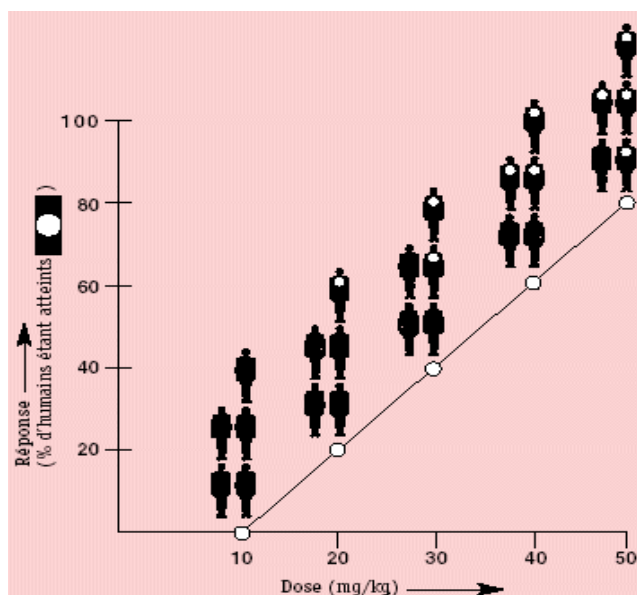


Figure 02: Relation entre la dose et la réponse (CSST, 2004).

I.5 La cytotoxicité

Est la propriété d'un agent toxique à détruire des cellules vivantes, par exemple (les médicaments cytostatiques) (**Bensakhria, 2018**).

- Cibles biologiques de l'action des cytotoxiques

Les membranes cellulaires peuvent être le siège d'altération diverses telles que la peroxydation lipidique, la perte de la perméabilité sélective de la membrane plasmique.

Au niveau de mitochondrie, ces toxiques inhibent la phosphorylation oxydative, la beta oxydation des acides gras, la respiration cellulaire, et par conséquent, entraînent une chute de la concentration d'ATP.

Au niveau des lysosomes, ils inhibent les capacités de dégradation des cellules (**Bensakhria, 2018**).

I.5.1 Méthodes couramment utilisées pour étudier la cytotoxicité

Il existe trois grands groupes de méthodes d'étude de la cytotoxicité

- a. Des méthodes fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire : il existe deux types
 - Méthodes de cytotoxicité utilisant des colorants : Cela dépend de l'utilisation de colorants pénétrants pour les membranes mortes ou vivantes, où le pourcentage de membranes colorées ou non colorées est un indicateur du nombre de cellule vivantes ou mortes, qui est un indicateur de la concentration de la substance toxique étudiée.
 - Méthodes mesurant le relargage des molécules dans le milieu extra cellulaire : Mesure de l'activité enzymatique LDH (Lactate Déhydrogénase) et de la libération de cytochrome.
- b. Des méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire : en tuant des cellules ou en bloquant le cycle cellulaire il existe deux groupes de méthodes :

Méthodes de numération et méthodes biochimique.

- c. Autres méthodes : ils existent d'autres méthodes à principe différents par exemple : Les méthodes morphologiques fondées sur l'étude de l'altération cellulaire jusqu'à la lyse (**Bensakhria, 2018**).

I.6 Evaluation des dangers

Les procédures d'évaluation de toxicité de produits chimiques ont été élaborées au fil des années et continuent d'évoluer en fonction des progrès de la science de la toxicologie.

Le processus d'évaluation des dangers regroupe trois activités principales : identifier le danger, évaluer l'exposition, et déterminer la relation exposition- réponse. Le résultat de l'évaluation des risques est communiqué aux instances dont le rôle est de proposer des articles réglementaires de contrôle des risques (**John M. Frazier, 1990**).

I.7 Essais de toxicité

Les essais de toxicités à des fins d'évaluation répondent à deux objectifs principaux :

1. Déterminer quels peuvent être les effets indésirables d'un produit chimique donné (identification du type de toxicité).
2. Obtenir des informations adéquates pour définir le rapport exposition- réponse chez l'homme et d'autre organisme.

Les premiers essais de toxicité se limitaient le plus souvent à des essais de toxicité aiguë. L'essai classique DL50, qui a été initialement conçu pour étudier les matériaux biologiques utilisés à des fins médicales, repose sur une approche statistique permettant de déterminer la dose à laquelle un produit chimique provoque la mortalité de 50 % des animaux d'une population donnée (**John M. Frazier, 1990**).

- Deux approches méthodologiques sont envisageables :

I.7.1 Les tests de toxicité in vivo

Le mot "in vivo" est utilisé pour décrire des expériences, des études ou des observations réalisées dans un organisme vivant ou un modèle animal. Il s'agit d'une approche de recherche qui se déroule à l'intérieur d'un organisme complet plutôt que dans un environnement artificiel ou isolé en laboratoire.

Les études "in vivo" permettent de mieux comprendre les interactions complexes entre différents systèmes biologiques, les effets d'un traitement ou d'une substance sur l'organisme dans son ensemble, ainsi que les réponses physiologiques, biochimiques ou comportementales qui peuvent se produire (**Festing, 2007**).

Voici quelques exemples d'études "in vivo" :

1. Études pharmacologiques : Les études "in vivo" peuvent être utilisées pour évaluer l'efficacité des médicaments sur des animaux de laboratoire. Ces études permettent de déterminer l'effet des médicaments sur les organes, les tissus et les systèmes biologiques dans un contexte physiologique plus complet.
2. Études physiologiques : Les études "in vivo" peuvent être utilisées pour étudier les réponses physiologiques de l'organisme à divers stimuli ou conditions. Par exemple, l'utilisation de techniques "in vivo" permet de mesurer les niveaux d'hormones dans le sang, d'observer les changements dans la pression artérielle, de surveiller l'activité électrique du cerveau, etc.
3. Études de toxicologie : Les études "in vivo" sont souvent utilisées pour évaluer les effets toxiques de substances chimiques, de produits chimiques industriels ou de produits pharmaceutiques sur des modèles animaux. Cela permet de déterminer les effets à long terme, les interactions complexes et les éventuels effets secondaires indésirables.
4. Études de développement et de génétique : Les études "in vivo" peuvent être utilisées pour étudier le développement embryonnaire, la croissance, la différenciation cellulaire et les mécanismes génétiques impliqués. Des modèles animaux sont souvent utilisés pour comprendre les processus biologiques complexes liés au développement et à la génétique.

Ces exemples illustrent comment les études "in vivo" peuvent fournir des informations précieuses sur les interactions biologiques complexes et les réponses de l'organisme dans un contexte physiologique complet (**Festing, 2007**).

I.7.2 Les tests de toxicité in vitro

Les techniques in vitro présentent en effet certains avantages. En premier lieu, ils sont de par leurs natures susceptibles d'être plus rigoureusement normalisés que les essais in vivo. Il n'en est généralement pas de même pour les essais de toxicité in vivo en raison du coût prohibitif des contrôles tant positifs que négatifs des protocoles d'essai. Les essais in vitro, en revanche, se prêtent à de tels contrôles qui permettent ainsi de normaliser les essais individuellement. Le problème des différences entre espèces ne se pose plus avec les essais in vitro, car on peut utiliser directement des cellules de l'espèce concernée.

Un autre avantage est qu'on peut doser exactement la quantité de produit chimique apportée aux cellules, ce qui permet de déterminer avec précision les concentrations nocives de produit toxique. Par contre, *in vivo*, chez l'homme comme chez l'animal, il est souvent difficile de déterminer avec précision la dose de produit chimique présente dans les tissus affectés (**John M. Frazier, 1990**).

I.7.3 La méthode *in silico*

L'évaluation de l'irritation oculaire des produits et ingrédients est obligatoire dans plusieurs régions, mais les modèles animaux sont de plus en plus considérés comme insoutenables pour des raisons éthiques, économiques et scientifiques. Depuis 2013, les tests cosmétiques sur les animaux sont interdits dans l'union européenne et dans plusieurs autres pays. Pour répondre à cette problématique, Les pays européennes ont recours exclusivement aux tests *in vitro* pour l'évaluation des irritations oculaires, tandis que l'autres pays explorant l'utilisation de tests informatiques (*in silico*) pour améliorer l'efficacité des méthodes existantes (**M.N.Rivero et al, 2021**).

La recherche n'est plus seulement *in vivo* ou *in vitro*, mais utilise de plus en plus l'analyse informatique.

Des simulations *in silico* étudient les débuts de ce phénomène de biologie moléculaire viable. Le terme "*in silico*" fait référence à une approche de modélisation biomathématique qui utilise des données expérimentales *in vivo* ou *in vitro* pour effectuer des analyses à l'aide de logiciels informatiques (**G.Gallezot, 2002**).

Le fonctionnement d'*in silico* repose sur la création d'une base de données qui met en évidence la corrélation entre la structure et l'activité, et qui est utilisée dans la recherche de médicaments et le développement pharmaceutique.

L'utilisation de méthodes *in silico* dans la recherche pharmaceutique, la conception de médicaments et les tests de produits cosmétiques est de plus en plus répandue. Ces méthodes permettent d'étudier les propriétés pharmaceutiques des médicaments, ainsi que d'évaluer le degré de toxicité et d'irritation des cosmétiques avant leur mise sur le marché (**Ch.Pachoulide, 2021**).

Les industries pharmaceutiques et cosmétiques ont adopté la simulation numérique. Les simulations sont utilisées dès les premières étapes de conception pour augmenter les chances de sélectionner des molécules candidates efficaces pour les tests cliniques ultérieurs (**L'USINE NOUVELLE, 2019**).

I.8 La législation

I.8.1 La législation et les principaux acteurs dans le domaine des tests de produits cosmétiques

I.8.1.1 Au niveau européen

Il est interdit d'utiliser les résultats de tests sur animaux réalisés après le 11 mars 2009 et le 11 mars 2013 pour évaluer la sécurité des produits cosmétiques.

Il reste toujours impossible de se passer complètement de l'expérimentation animale pour étudier les effets couverts par l'interdiction de mise sur le marché de 2013.

Des avancées significatives ont été réalisées grâce aux efforts constants du laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes alternatives à l'expérimentation animale (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - ECVAM), géré par le Centre Commun de Recherche (CCR) de la Commission.

Pour les effets concernés par l'interdiction de mise sur le marché de 2009, des méthodes de substitution ont pu être validées et ont été adoptées comme lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) pour l'irritation et la corrosion cutanées, la photo toxicité et l'absorption cutanée. Des méthodes partielles de substitution ont également été validées pour la toxicité systémique aiguë et l'irritation oculaire, et ont été adoptées comme lignes directrices de l'OCDE pour cette dernière. Cependant, il reste impossible de remplacer complètement l'expérimentation animale pour l'étude des effets visés par l'interdiction de mise sur le marché de 2013 (**ANSM, 2016**).

I.8.1.2 Au niveau algérien

L'évaluation de la toxicité des matières premières et des produits finis est effectuée par le biais d'analyses et de tests, notamment pour évaluer la toxicité cutanée, dermique, oculaire et muqueuse (**Ministère du commerce, 2010**).

Il existe une liste de produits de consommation qui sont identifiés comme présentant des caractéristiques de toxicité ou de risque spécifiques, ainsi qu'une liste de substances chimiques qui sont interdites ou réglementées pour leur utilisation dans la fabrication de produits (**Ministère du commerce , 1997**).

En Algérie, il n'existe pas de texte légal spécifique autorisant ou interdisant l'utilisation de l'expérimentation animale pour garantir la sécurité des utilisateurs (**Ministère du commerce, 2010**).

De plus, les réglementations en vigueur en Algérie ne fournissent que des indications sur les procédures de fabrication, d'emballage, d'importation et de commercialisation, sans aborder spécifiquement les questions liées à l'expérimentation animale (**Ministère du commerce, 1997**).

I.8.2 Les structures institutionnelles encadrant la sécurité d'emploi des cosmétiques

I.8.2.1 Au niveau Européen

I.8.2.1.1 Le Parlement Européens

Le Parlement européen a proposé d'établir une date limite à laquelle les nouveaux produits chimiques mis sur le marché dans l'Union européenne ne seraient plus autorisés à être testés sur des animaux, que ce soit en tant qu'ingrédients ou produits finis. L'objectif était de stimuler le développement et la validation de méthodes alternatives.

Le Parlement a exigé que l'interdiction soit mise en place sans tenir compte de la disponibilité de méthodes alternatives. Étant fermement attaché à ce principe, le Conseil des ministres a dû arriver à une décision unanime (**Francopa, 2010**).

I.8.2.1.2 Le conseil d'UE

Il est composé des ministres des États membres. Représente le principal organe législatif de l'UE, il exerce un pouvoir généralement en codécision avec le Parlement Européen.

Il examine également les propositions de la Commission Européenne et peut les modifier avant de les approuver (**Institutions et autres organes de l'UE, s.d.**).

I.8.2.1.3 La Commission européenne

La production, l'évaluation de l'innocuité et la commercialisation des produits chimiques au sein de l'Union européenne impliquent plusieurs directions générales (DG) de la Commission. La Direction générale de la Recherche de l'Union européenne est chargée de la mise en place de la politique de recherche et de technologie de l'Union, y compris le développement de nouvelles méthodes d'évaluation des risques et d'innocuité des nouveaux produits chimiques (**Francopa, 2010**).

I.8.2.1.4 Le SCCNFP

Le SCCNFP est un comité scientifique qui fournit son expertise à la Commission européenne sur les questions scientifiques et techniques liées à l'évaluation de l'innocuité des produits cosmétiques et non alimentaires (**Francopa, 2010**).

I.8.2.1.5 L'ECVAM

Situé à Ispra, en Italie, le Centre commun de recherches de la Commission européenne abrite le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM).

L'ECVAM est responsable de la supervision et de la réalisation d'études visant à valider des méthodes de substitution ou de limitation des tests sur les animaux, pour les produits de consommation courante ainsi que les produits pharmaceutiques (**Francopa, 2010**).

I.8.2.1.6 L'OCDE

L'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) est l'autorité mondiale responsable de l'élaboration des directives officiellement reconnues pour les tests de substances chimiques. En plus cela, l'OCDE fournit des conseils sur divers sujets, y compris les procédures de validation des nouvelles méthodes de test (**Francopa, 2010**).

I.8.2.2 Au niveau algérien

I.8.2.2.1 Le CACQE

Centre Algérienne du Contrôle de la Qualité et de L'emballage, Agence de l'administration publique la tutelle du ministère du commerce, qui joue un rôle dans la protection des consommateurs par le contrôle de la qualité et la lutte contre les fraudeurs (**I.Tahir, 2021**).

I.8.2.2.2 Les laboratoires de toxicologie relevant du ministère de la santé

Est chargé de l'évaluation et du contrôle toxicologique des produits cosmétiques. L'objectif principal de ce laboratoire est d'améliorer la qualité des produits cosmétiques, pour la beauté sans nuire à la santé en effectuant des analyses qui garantissent la sécurité et l'efficacité de ces produits cosmétiques (**R.Lambert, 2013**).

CHAPITRE II :
LES TESTS IN
VITRO

II. LES TESTS IN VITRO

II.1 Méthodes d'évaluation de la toxicité in vitro

Si l'utilisation d'animaux dans la recherche est nécessaire, l'acceptation générale est conditionnelle à la compréhension que le minimum de douleur sera causé par le nombre minimum d'animaux pour fournir le maximum d'avantages aux humains, aux autres animaux et à l'environnement, d'un maximum de méthodes basées sur des tests in vitro. Elle s'appuie sur le principe des **3R** et sur les comités d'éthique (**Arthur Clark, 2017**).

Règle des 3R : Réduire, Raffiner, Remplacer

Ces trois principes, également connus sous le nom de 3R ont été définis en 1959 par W.M.S. Russell et RL Burch dans leur écriture bien conçue et scientifiquement valide sur ce sujet «les principes de l'expérimentation humaine techniques (**Arthur Clark, 2017**). Elle est anticipée par les scientifiques eux-mêmes, qui illustrent en cela la phrase de Jean-Bernard " tout ce qui n'est pas scientifique n'est pas éthique" (**pharmacie, 29 juin 2017**).

II.1.1 Réduire

Réduire le nombre d'animaux utilisés n'est peut-être pas la meilleure solution pour des résultats éthiques et bien-être.

1-trop peu d'animaux utilisés peuvent conduire à des résultats qui sont statistiquement difficiles ou impossibles à interpréter avec précision (**Arthur Clark, 2017**).

2-même si cela implique l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux, un équilibre doit être atteint entre la minimisation du nombre total tout en obtenant des résultats fiables (**Arthur Clark, 2017**).

II.1.2 Raffiner

Il existe un principe sous-jacent selon lequel un bien-être médiocre est en contradiction avec une bonne science. Par conséquent, en plus de nos obligations éthiques d'optimiser le bien-être, la justification scientifique du raffinement est convaincante. Dans le cadre de l'approche contemporaine, le raffinement comprend de nouvelles technologies in vivo qui minimisent les douleurs ou la détresse ressentie par les animaux ainsi que la gamme de méthodes qui améliorent les soins, le logement, la manipulation et l'utilisation des animaux (**Arthur Clark, 2017**).

II. 1.3 Remplacer

Le procédé de remplacement de modèles animaux est parfois possible pour travailler sur des cellules, des tissus, voire sur des modèles numériques. L'utilisation de modèles in vitro ou in silico est l'objectif du chercheur, bien qu'il puisse être atteint dans de nombreux domaines, notamment en matière de sécurité. Ces techniques sont des alternatives pour réduire l'utilisation des animaux dans la recherche scientifique (**Arthur Clark, 2017**).

II.2 Les tests de toxicité locale

II.2.1. Test d'Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué (OCDE n°439)

C'est un test mené en laboratoire pour déterminer les risques posés par les produits chimiques irritants (substances et mélanges) conformément à la catégorie 2 du système général harmonisé de classification et d'étiquetage SGH (le Système Général Harmonisé) de l'ONU (Organisation des Nations Unies) , elle s'appuie sur un épiderme humain reconstitué, qui dans sa conception globale, reproduit les propriétés biochimiques et physiologiques de la partie supérieure de la peau humaine. Des manifestations sont observées sous forme d'œdèmes et de rougeurs, l'exposition intense conduit à la pénétration du composant chimique à travers la première couche de la peau, où celle-ci exerce des effets toxiques qui entraînent des dommages aux kératinocytes et de nombreux effets cytotoxiques sur la peau (**OCDE N° 439, 14 juin 2021**).

- Principe du test

-le produit chimique est appliqué localement sur 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, ainsi que d'un stratum corneum multicouche contenant des couches lipidique lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, similaires à celles que l'on observe in vivo (**OCDE N° 439, 14 juin 2021**) .

-la viabilité cellulaire du modèle d'épiderme humain reconstitué est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol- 2-yl)-2,5-diphényltétrazolium] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus.

Les produits chimiques irritants sont mis en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé (≤ 50 %, pour la catégorie 2 du SGH de l'ONU). En fonction du cadre législatif et de l'applicabilité de la présente ligne directrice, les produits chimiques testés produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants (> 50 %, sans catégorie) (**OCDE N° 439, 14 juin 2021**).

II.2.2 Tests d'Eyetex

Ce test consiste à évaluer in vitro l'effet d'une substance nocive sur une matière synthétique à base de protéines végétales. En rétablissant la biochimie de dénaturation des protéines cornéennes, on peut évaluer l'interaction que l'œil réel aurait entré en contact avec la substance (**Anderson, 1990**).

II .2.3 Test sur œil de poulet isolé (OPI) (OCDE n° 438)

Est une méthode in vitro pouvant être utilisée pour classer des produits chimiques (substances ou mélanges) parmi les substances causant des lésion oculaires graves catégorie 1 du système général harmonisé pour la classification et l'étiquetage des produits chimiques (SGH) , ou pour identifier les produits chimiques non classés (ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave selon le SGH) , la méthode OPI utilise des yeux prélevés sur des poulets provenant d'abattoirs , où ils sont tués à des fins de consommation humaine , évitant ainsi le recours à des animaux de laboratoire(**OCDE N° 438, 25 juin 2018**).

- Principe du test

C'est un modèle organotypique qui permet le maintien à court terme d'œil 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. De plus, un examen histopathologique peut être réalisé pour renforcer la sensibilité de la méthode dans l'identification desdétergent et tensioactifs à PH non extrême ($2 < \text{pH} < 11.5$) relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (**OCDE N° 438, 25 juin 2018**).

II.2.4 Test de HET-CAM

Le test HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoïque Membrane), utilisant la membrane chorioallantoïque (CAM) de l'embryon de poulet, est un test alternatif pour remplacer le test oculaire de lapin de Draize. Le CAM est un tissu complet comprenant des artères, des capillaires et des veines, et est techniquement facile à clouter. Par le droit de cette méthode, les produits chimiques sont placés en contact direct avec la membrane chorioallantoïque de l'œuf de poulet. Les changements de lésions vasculaires (hémorragie, lyse ou coagulation) sont des indications du potentiel du produit chimique à endommager les muqueuses in vivo. Le but de cette étude était d'étudier l'irritation oculaire potentielle des produits agrochimiques dans le test HET-CAM (**Péter & KORMOS, 11 February 2010**).

II.2.5 Test de photo toxicité (OCDE n° 432)

Le test de photo toxicité in vitro permet de déterminer le potentiel photo-toxique d'une substance d'essai, induite par l'excitation d'un produit chimique après exposition à la lumière. Ce test évalue la réduction relative de la viabilité des cellules exposées au produit chimique, en présence ou absence de lumière. Les substances identifiées par cet essai sont susceptibles d'être photo toxiques in vivo après administration systémique et diffusion dans la peau, ou après application topique (**OCDE N° 432, 13 avril 2004**).

- Principe du test

La photo toxicité 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 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 lysosomes. L'altération de la surface cellulaire de la membrane lysosomale sensible entraîne une fragilité lysosomale et d'autres modifications qui deviennent graduellement irréversibles. Ces modifications induites par l'action de xénobiotiques entraînent une diminution de la fixation du rouge neutre, sur la base de laquelle on peut distinguer les cellules vivantes, des cellules mortes ou abimées (**OCDE N° 432, 13 avril 2004**).

II.3 Les tests de toxicité systémique

II.3.1 Test d'Ames mutation reverse sur bactéries (OCDE n° 471)

Les tests bactériens de mutation sont pratiqués sur des souches de salmonella typhimurium et d'Escherichia coli auxotrophes à l'égard d'un acide aminé .ils servent à détecter des mutations ponctuelles résultant de la substitution , de l'addition ou de la délétion d'une ou de quelques paires de bases de l'ADN le principe de ces tests bactériens de mutation réverse repose sur la détection de mutations qui inversent des mutation présentes dans la souche d'essai et rétablissent ainsi la capacité fonctionnelle des bactéries de synthétiser un acide aminé indispensable. Les bactéries révertants sont détectées d'après leur capacité de se développer en l'absence de l'acide aminé requis par la souche d'essai parentale (**OCDE N° 471, 21 juillet 1997**).

•Principe du test

Les bactéries en suspension sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'activation métabolique externe .dans la méthode d'incorporation directe dans la boite (méthode par étalement) , les suspensions sont mélangées avec une couche d'agar de surface et déposées immédiatement sur un milieu minimum dans la méthode de pré-incubation , le mélange de traitement est incubé et ensuite mélangé avec une couche d'agar de surface avant d' être étalé sur un milieu minimum . Dans les deux techniques, après deux ou trois jours d'incubation, les colonies révertants sont comptées et leur nombre est comparé à celui des révertants spontanés dans les boites témoins traitées avec le solvant (**OCDE N° 471, 21 juillet 1997**).

II.3.2 Test de mutation génique sur cellules de mammifère (OCDE n° 476)

Les tests in vitro de mutation génique sur des cellules de mammifères peuvent être employés pour détecter des mutations induites par les substances chimiques.

Dans cet essai, les systèmes génétiques utilisés permettent de détecter une mutation sur les loci de l'hypo xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) et d'un transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XPRT) les essais de la mutation de HPRT et de XPRT détectent différents types d'événements génétiques (**OCDE N° 476, 29 juillet 2016**).

•Principe du test

Des cellules mutantes déficientes en HPRT dans le test HPRT ou en XPRT dans le test XPRT sont résistantes aux effets cytostatiques de la 6-thioguanine (TG), un analogue de la purine. Les cellules munies de l'enzyme HPRT (dans le test HPRT), qui entraîne une inhibition du métabolisme et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, des cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TG, tandis que des cellules normales qui contiennent l'enzyme HPRT (test HPRT), ne le peuvent pas (**OCDE N° 476, 29 juillet 2016**).

II.3.3 Test d'échange de chromatides sœurs (OCDE N° 479)

Le test d'échange de chromatides sœur (SCE) est un test de courte durée pour la détection des échanges réciproques d'ADN entre deux chromatides sœur d'un chromosome se dédoublant. La détection des SCE exige quelques moyens de marquages différents pour chacune des chromatides sœur (**OCDE N° 479, 1986**).

•Principe du test

- La substance d'essai doit être sous forme solide, liquide, vapeur ou gazeuse.
- Les cellules de mammifères sont exposées au produit chimique d'essai avec et sans système d'activation métabolique exogène de mammifère et cultivées in vitro. Doit utiliser un minimum de trois concentrations convenablement espacées de la substance d'essai. Après traitement avec un fuseau inhibiteur de l'agrégation cellulaire dans la métaphase de la mitose (phase C), les cellules sont récoltées et des préparations chromosomiques sont réalisées (**OCDE N° 479, 1986**).

II.3.4 Test d'aberration chromosomique in vitro sur cellules de mammifère (OCDE N° 473)

Un test d'aberration chromosomique in vitro identifie les facteurs qui provoquent des aberrations structurelles des chromosomes dans des cellules de mammifères en culture. Les aberrations structurelles peuvent être de deux types : chromosomiques ou chromatidiques (**OCDE N° 473, 29 juillet 2016**).

•Principe du test

Des cultures cellulaires d'origine humaine ou d'autres mammifères sont exposées au produit chimique testé, en présence et en l'absence d'une source externe d'activation métabolique. Pour prévenir la métaphase, et pour être récoltées et fixées, les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique pour détecter les chromatides et les chromosomes aberration (**OCDE N° 473, 29 juillet 2016**).

II.3.5 Test des comètes (OCDE N° 489)

L'essai in vivo d'électrophorèse sur gel en conditions alcalines de cellules isolées, aussi appelé test des comètes est une méthode mesurant les cassures de brins d'ADN dans les cellules eucaryotes (**OCDE N° 489, 29 juillet 2016**).

●Principe du test

Le test des comètes a pour objet d'identifier les substances causant des dommages à l'ADN. En conditions alcalines ($\text{pH} > 13$), le test des comètes peut détecter les cassures simples et doubles brin résultant, par exemple, d'interactions directes avec l'ADN, de sites alcali labiles ou de cassures transitoires liées à des mécanismes de réparation par excision. Ces cassures peuvent être réparées, leur effet étant alors non persistant, elles peuvent être bénéfiques pour la cellule, ou elles peuvent se fixer sous forme de mutation stable se traduisant par une altération viable permanente. Elles peuvent aussi entraîner des dommages chromosomiques du type de ceux qui sont associés à de nombreuses maladies humaines comme le cancer (**OCDE N° 489, 29 juillet 2016**).

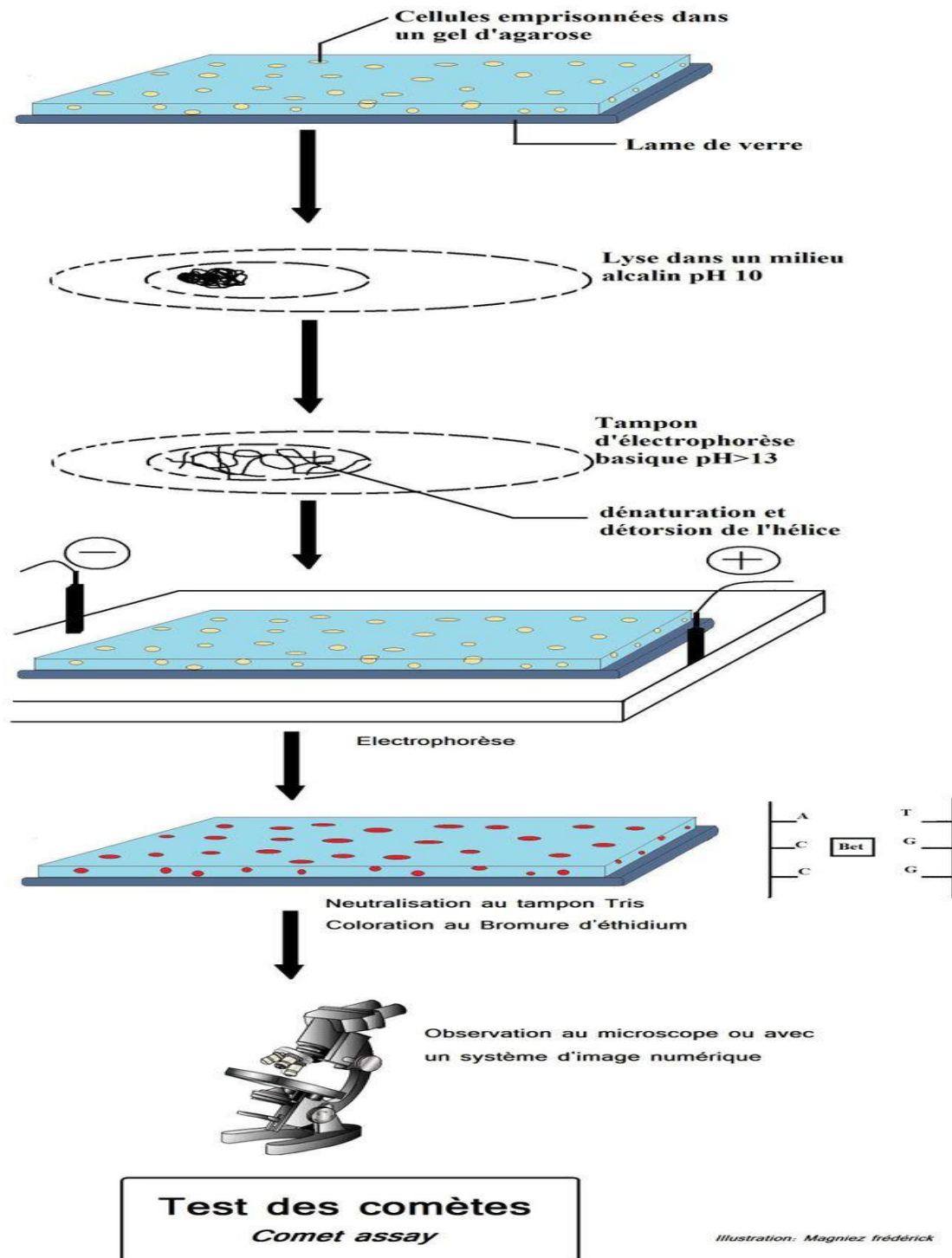


Figure 03 : Test des comètes (Mr, 2010).

II. 4 Avantages et limites des méthodes in vitro

II.4.1 Les Avantages

1. Expliquer un mécanisme d'action.
2. Multiplier les essais.
3. Suivre avec précision les phénomènes dans le temps.
4. Limiter le nombre d'animaux d'expérience : avantage éthique (**FRANK, 1991**).

II.4.2 Les Limites

1. Absence des mécanismes de filtrage in vivo.
2. Elles ne reflètent donc pas la réalité physiologique.
3. L'incapacité d'établir une corrélation précise entre dose et toxicité (**FRANK, 1991**).

CHAPITRE III :
TESTE HET-CAM

III. HET-CAM TEST

III.1 Historique

Le test de la membrane chorioallantoïque de l'œuf de poulet (HET-CAM) a été développé par Luepke comme alternative au test Draize sur l'œil de lapin, qui était historiquement la méthode de référence pour l'évaluation de l'irritation oculaire.

Le test Draize a été critiqué pour sa subjectivité dans l'évaluation, sa faible reproductibilité, les différences anatomiques entre l'œil humain et l'œil de lapin et pour des raisons éthiques.

Au fil des années, des efforts spécifiques ont été consacrés au développement de méthodes alternatives sans animaux pour évaluer l'irritation oculaire, dont le HET-CAM.

Le HET-CAM est considéré comme un modèle approprié pour le tissu conjonctival de l'œil et permet la visualisation de réactions irritantes telles que l'hémorragie, la lyse, la coagulation et l'hyperémie sur la membrane chorioallantoïque des œufs de poulet fécondés avec des embryons de sept à neuf jours.

Le test HET-CAM est déjà utilisé dans l'industrie pour identifier les matériaux potentiellement non irritants ou légèrement irritants lors du criblage interne et des évaluations de sécurité des formulations et/ou des matières premières, ainsi que dans le cadre d'évaluations de preuve.

Le test HET-CAM a subi plusieurs modifications pour permettre le test d'irritation oculaire de matériaux avec différentes propriétés physicochimiques, et a été évalué dans plusieurs études de validation.

Les études ont montré une corrélation utile avec le test Draize sur l'œil de lapin pour l'évaluation des produits cosmétiques, en particulier pour les matériaux de test légèrement et non irritants, ainsi que pour les tensioactifs et les formulations à base de tensioactifs.

Le test HET-CAM a été évalué par le groupe d'experts du Comité de coordination inter-agences sur la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) et le Centre inter-agences du programme national de toxicologie pour l'évaluation des méthodes alternatives de toxicologie (NICEATM), qui ont publié un protocole recommandé.

Le protocole de test fournit des directives pour l'utilisation du test HET-CAM dans les évaluations de sécurité des produits chimiques, et contribue ainsi à la promotion de méthodes alternatives sans animaux pour l'évaluation de l'irritation oculaire (**M.N.Rivero et al, 2021**).

III.2 Définition

Le HET CAM ou test de la membrane chorioallantoïque de l'œuf de poulet fertile est un test utilisé pour déterminer le potentiel d'irritation des substances et est un test alternatif au test «Draize Rabbit Eye » (**S.Dragland, 2013**).

Le test HETCAM (Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane) est une méthode de test *in vitro* utilisée pour évaluer le potentiel d'irritation et/ou de corrosion des produits chimiques et des produits cosmétiques en observant les changements indésirables qui se produisent dans la membrane chorioallantoïdienne CAM de l'œuf de poulet en développement après exposition à ces produits.

La CAM est considérée comme un modèle approprié pour étudier l'irritation des tissus muqueux et la coagulation (dénaturation des protéines) peut refléter des dommages cornéens qui peuvent être produits par le produit testé.

Le test HETCAM est basé sur l'hypothèse que les effets aigus induits par une substance de test sur les petits vaisseaux sanguins et les protéines de cette membrane tissulaire souple seraient similaires aux effets induits par la même substance de test sur l'œil d'un lapin traité « Draize » (**A.S.Kishore et al, 2008**).

Le test HETCAM permet d'évaluer les effets irritants de substances liquides ou solides sur la membrane vasculaire vitale du CAM des œufs de poulet incubés pendant 10 jours. Les effets observés sont notés et classés afin de fournir une évaluation des risques similaire à celle obtenue avec le test oculaire de lapin Draize (**LEUPKE et KEMPER, 1986**). Le test HET-CAM est un modèle utile pour évaluer les lésions oculaires, en particulier pour la conjonctive. Il évalue les effets d'une substance sur la vascularisation et les réponses inflammatoires de la membrane chorioallantoïque des œufs de poulet fécondés.

Les critères évalués (hémorragie, coagulation, hyperémie ou lyse) diffèrent de ceux évalués dans le test *in vivo*, mais ils sont considérés comme étant en corrélation avec les mécanismes de toxicité à l'origine des effets *in vivo* (écoulement de la conjonctive, rougeur et œdème) (**B.M.Kenzie et al, 2015**).

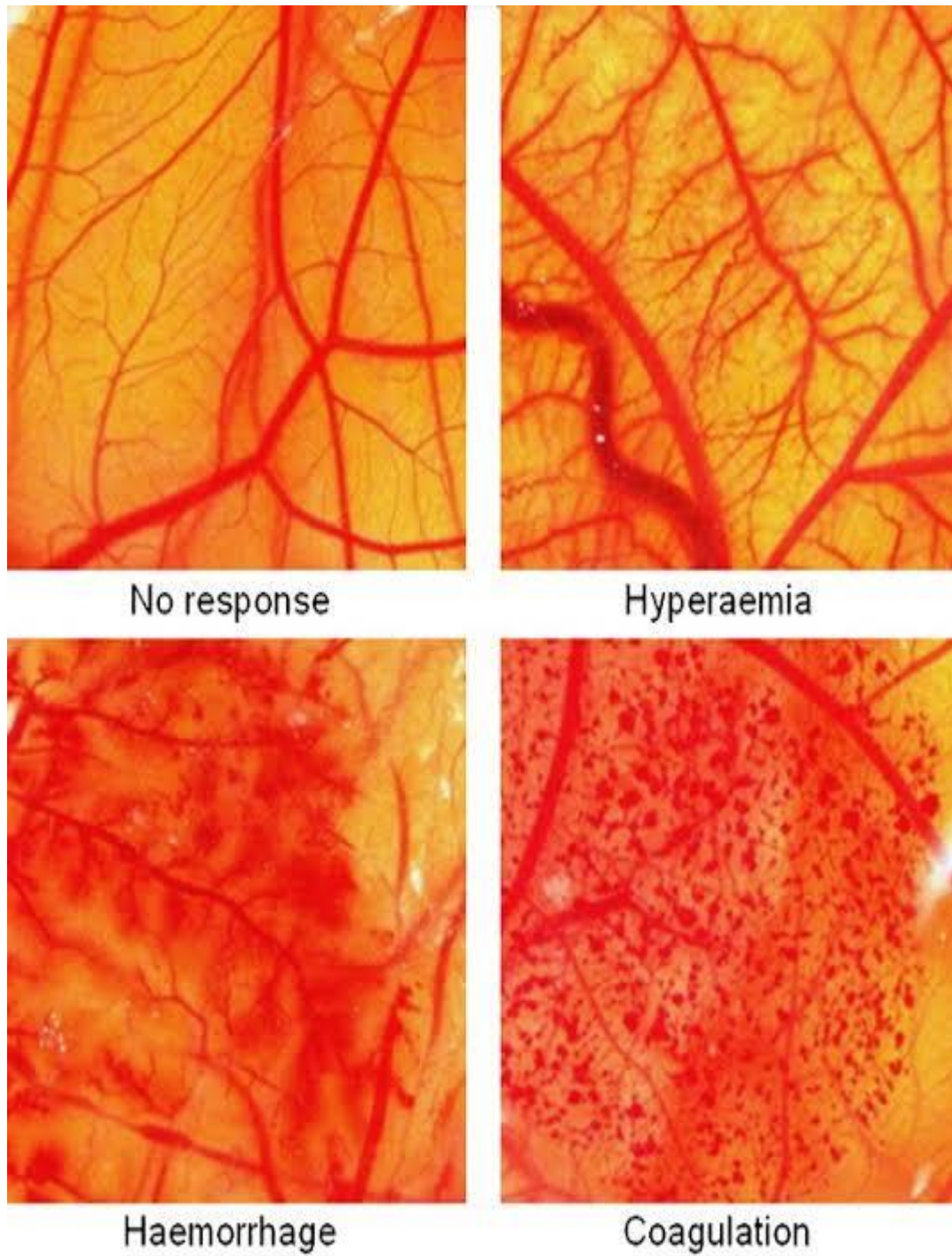
III.3 Principe de test

Le principe de ce test consiste à appliquer une certaine quantité de la substance testée sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM) d'un œuf de poule incubé.

La CAM est une membrane vascularisée qui permet l'échange gazeux de l'embryon dans l'œuf. Après l'application de la substance testée, l'effet irritant est évaluée en observant les changements sur la CAM, tels que la dilatation des vaisseaux sanguins, la nécrose tissulaire ou l'hémorragie (**W.Steiling et al, 1999**).

La présence ou l'absence de ces changements est utilisé pour prédire le potentiel irritant de la substance testée et enregistrés et notés selon un système de notation standardisé (**X.Yan et al, 2007**).

Le test HETCAM a été reconnu comme un test valide pour prédire les irritations sévères en particulier dans l'industrie cosmétique (**W.Steiling et al, 1999**).



**Figure 04: Des phénomènes observés sur la CAM dans le test HET-CAM
(I.D.Rupenthal et al, 2011).**

III.4 Objectif de test

L'objectif principal du test HET est de prédire le potentiel d'irritation ou de corrosion des produits chimiques d'hygiène personnelle sur la peau et les yeux humains. Le test utilise des œufs fécondés de poulet et mesure la réaction de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) à la substance testée.

Le test HET-CAM est considéré comme un modèle alternatif *in vitro* aux tests sur les animaux et surtout Draize l'œil de lapin, et est souvent utilisé comme un test de dépistage primaire pour les nouveaux ingrédients ou les nouvelles formulations de produits cosmétiques avant de les diriger vers le marché et l'utilisation personnelle. En raison de la similarité histologique entre la membrane CAM des œufs de poulet incubés et les tissus de la conjonctive de l'œil humain, le test CAM est considéré comme une méthode extrêmement sensible pour évaluer les substances légèrement à modérément irritantes, ainsi que les irritants puissants. La sensibilité est attribuée à la similitude entre la réponse de la membrane CAM et la réponse de l'œil humain aux substances testées. En de la similarité histologique entre la membrane CAM des œufs de poulet incubés et les tissus de la conjonctive de l'œil humain, le test CAM est considéré comme une méthode extrêmement sensible pour évaluer les substances légèrement à modérément irritants, ainsi que les irritants puissants. La sensibilité est attribuée à la similitude entre la réponse de la membrane CAM et la réponse de l'œil humain aux substances testées (X.Yan et al, 2007).

III.5 La membrane chorioallantoïdienne MCA

III.5.1 Définition

La membrane chorioallantoïdienne (CAM) est une membrane extra embryonnaire qui se développe dans les œufs de poulet et de certains autres oiseaux.

La CAM aviaire est la couche extérieure de la membrane extra-embryonnaire qui recouvre la membrane de coquille d'œuf non cellulaire, Elle se forme par la fusion de mésoderme splanchnique de l'allantoïde et de mésoderme somatique du chorion.

Chez le poulet, elle se développe et recouvre toute la surface de la membrane interne de la coquille à partir de 10^{ème} jour d'incubation, et le poussin éclot normalement au 21^{ème} jour. La CAM joue un rôle important en supportant les capillaires respiratoires extra-embryonnaires, en transportant activement des ions tels que le sodium, le chlorure et le calcium, et en formant une partie de la paroi du sac allantoïque qui collectent les déchets métabolique (T.I.Valdes et al, 2002).

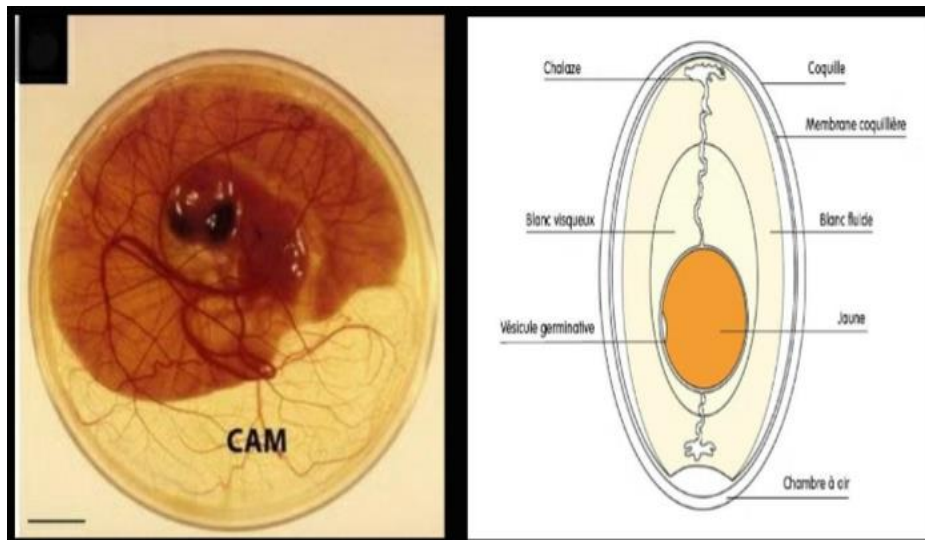


Figure 03: La membrane chorioallantoïdienne (CAM) (P.Nowak-Sliwinska et al, 2014).

III.5.2 Les caractéristiques de CAM

La CAM utilisé comme un modèle in vitro important pour évaluer la toxicité potentielle des substances en raison de ses caractéristiques :

- La CAM est très vascularisée, ce qui permet d’observer rapidement les effets de la substance sur les vaisseaux sanguins, qui peuvent réagir rapidement aux stimuli irritants.
- La membrane chorioallantoïdienne est reliée à l’embryon par un système circulatoire continu qui est aisément accessible pour les manipulations et les observations expérimentales.
- La CAM est une membrane très fine, ce qui facilite l’observation des changements morphologiques et les signes d’irritation ou de lésions après exposition à la substance testée.
- La CAM présente des similitudes anatomiques et physiologiques avec les tissus de la peau et des yeux humains, ce qui permet de détecter les effets potentiels de la substance testée sur les tissus(A.M.Cimpean et al, 2008).
- Le modèle de CAM permet une évaluation rapide des réactions tissulaires aux biomatériaux de sert d’étape intermédiaire entre les tests réalisés sur des modèles plus simples.
- Le model CAM est une méthode courante pour étudier les phénomènes biologiques en raison de son faible coût, de la simplicité de procédure chirurgicale et de la possibilité d’observer en continu le site de test sans le perturber.

- Le modèle CAM constitue un système in vivo réel qui peut servir d'étape intermédiaire entre une culture cellulaire et un modèle mammifère plus complexe. Il est capable d'évaluer à la fois les réponses inflammatoires aiguës et chroniques aux biomatériaux, ainsi que le potentiel irritant des substances chimiques (**T.I.Valdes et al, 2002**).

III.6 Avantages et limites de test

III.6.1 Avantages

- Alternative à l'expérimentation animale : Le test HETCAM est une méthode in vitro qui remplace l'utilisation d'animaux vivants pour évaluer l'irritation oculaire des produits chimiques. Cela réduit le nombre d'animaux utilisés à des fins de recherche et répond aux préoccupations éthiques liées à l'expérimentation animale.
- Pertinence pour les tissus muqueux vasculaires : La membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'œuf de poulet en développement, utilisée dans le test HETCAM, est considérée comme un modèle approprié pour étudier l'irritation des tissus muqueux. Elle présente une vascularisation similaire à celle des muqueuses oculaires humaines.
- Corrélation avec les effets oculaires : Le test HETCAM est basé sur l'hypothèse selon laquelle les effets induits par une substance de test sur les vaisseaux sanguins et les protéines de la CAM seront similaires à ceux observés sur l'œil d'un lapin traité. Ainsi, les effets indésirables sur la CAM peuvent être corrélés à l'irritation et/ou à la corrosion des yeux humains.
- Evaluation de la réaction vasculaire : Le test HETCAM permet d'observer les changements vasculaires, tels que la vasoconstriction, la vasodilatation, l'hémorragie ou la coagulation, qui peuvent survenir après l'exposition à une substance de test. Ces réactions vasculaires fournissent des indications sur l'irritation potentielle de la substance sur les tissus oculaires (**X.Yan et al, 2007**).
- Sensibilité aux produits chimiques : Le test HETCAM peut détecter les effets irritants des produits chimiques, qu'ils soient sous forme liquide ou solide. Il peut également être utilisé pour évaluer d'autres paramètres tels que la photo toxicité ou l'absorption cutanée (**ICCVAM, 2006**).

- Validation et adoption : Le test HETCAM a été validé et adopté comme méthode de remplacement partielle pour l'évaluation de la toxicité systémique aigue et de l'irritation oculaire par l'Organisation de coopération et de développement économiques(OCDE). Cela démontre la reconnaissance internationale de son utilité et de sa fiabilité (**OECD N°437, 2008**).
- Cout et temps réduits : En comparaison avec les tests sur animaux traditionnels, le test HET présente des avantages significatifs en termes de couts et de temps. Il est généralement plus rapide, plus facile à mettre en place et moins couteux, ce qui en fait une option attrayante pour les laboratoires de recherche et les industries (**X.Yan et al, 2007**).

III.6.2 Limites

Il convient de noter que malgré ses avantages, le test HETCAM a également des limites, et son utilisation est souvent complétée par d'autres méthodes d'évaluation de la sécurité des produits chimiques et des cosmétiques.

- Le test HET-CAM est sujet à une évaluation subjective en raison de sa dépendance à l'évaluation visuelle des changements vasculaires de la membrane chorioallantoïdienne des œufs de poulet incubés, cela peut entraîner une certaine subjectivité des résultats.
- En règle générale, cette méthode est fortement corrélée avec les résultats in vivo pour les irritants forts, mais semble avoir une corrélation moins précise lorsqu'elle est utilisée pour tester des agents légèrement irritants (**C.Debbasch et al, 2005**).
- L'évaluation d'un effet indésirable peut être altérée par la présence de substances d'essai colorées, ce qui peut rendre l'évaluation moins claire et complète (**LEUPKE et KEMPER, 1986**).
- Le test n'est approprié que pour une évaluation à court terme de la capacité irritante d'une substance d'essai.
- Il n'est pas possible de procéder à une évaluation lorsqu'on utilise des produits chimiques opaques, car ces substances recouvrent la membrane et empêchent l'observation (**W.Steiling et al, 1999**).
- La méthode de rinçage du test HET-CAM peut être utilisée pour tester les formulations en poudre ou en granulés, mais elle est plus complexe que la méthode simple en raison des dommages potentiels causés par le rinçage.

- La durée maximale d'observation pour évaluer les effets post-traitement dans la méthode de test HET-CAM est limitée à cinq minutes. En conséquence, les effets potentiellement réversibles qui persistent au-delà de cette période ou les effets qui se manifestent avec un retard ne peuvent pas être évalués de manière adéquate avec cette méthode (**P.Budai et al, 2010**).

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODE

I. MATERIEL ET METHODE

Ce travail a été réalisé au niveau de la plateforme technologique de l'école nationale de polytechniques de Constantine du 2 au 11 mai 2023.

I.1. Matériel

I.1.1 Réactifs

On a utilisé pour la réalisation du test les réactifs suivants

- Sérum physiologique 0,9 % comme un témoin négatif.
- NaOH 0,1 M comme un témoin positif.

I.1.2 Instruments

- Étuve biologique de la marque memmert®, avec un écran numérique permettant le réglage de la température et la durée d'incubation.
- Une lampe pour visionner la membrane hélicoïdale.
- Des ciseaux pour éliminer la partie dure de l'œuf.
- Chronomètre pour calculer la durée d'apparitions des effets.
- Balance de précision pour la mesure du poids les produits à tester.

I.1.3 Verrerie

- Bêchers.
- Pipettes en verre.
- Micropipettes réglable de 1000 μ L.

I.1.4 Œufs de poulet embryonnés

On a utilisé des œufs de poulet embryonnés (nombre=29), ramené de 3 sources d'élevage de poulets, les œufs embryonnés sont ramenés à un âge de 3 jours en moyenne (ne dépassant pas les 7 jours).

I.1.5 Produits à tester

- Huile essentiel de la lavande (0,3 ml) concentrée.
- Huile essentiel du géranium (0,3 ml) concentrée.
- Huile essentiel de la Teatree (0,3 ml) concentrée.
- Huile essentiel de la Palmarosa (0,3 ml) concentrée.
- Des polymères d'alginate (0,3 g).
- Ortho silicate de tétraéthyle (TEOS) à un volume de 0,3 ml.
- Triéthylène glycol diméthacrylate à un volume de 0,3ml.

CHAPITRE IMATERIEL ET METHODE

I.2. Méthode

On a utilisé le protocole recommandé par l'ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

L'objectif de ce protocole est de tester l'irritation cutanée locale et particulièrement oculaire évaluée par le pouvoir d'entraîner une toxicité au niveau de la membrane chorioallantoïque des œufs de poulets embryonnés.

Les effets mesurés sont les suivants,

- Lyse des vaisseaux
- Hémorragie
- Coagulation

Le temps d'apparition de chaque effet est mentionné, et un score d'irritation est calculé à la fin du test.

I.2.1 Réception des œufs

- Les œufs de poulet utilisés sont frais, fertiles et propres.
- Le transfert des œufs a été effectué dans des contenants n'affectant pas la viabilité et la croissance de l'embryon, à une température ambiante (25 à 26°C).

I.2.2 Incubation

- Les œufs sont placés dans l'étuve biologique à une température de 37°C pendant 10 jours.
- les œufs sont mis dans des plateaux pour œufs.
- les œufs sont retournés manuellement trois fois par jour.

I.2.3 Préparation des produits à tester

Tableau 2 : Préparation des produits à tester.

Produit	Préparation
HE Lavande concentrée	Mesurer avec la micropipette réglable un volume de 0,3 ml.
HE géranium concentrée	Mesurer avec la micropipette réglable un volume de 0,3 ml.
HE Teatree concentrée	Mesurer avec la micropipette réglable un volume de 0,3 ml.
HE Palmarosa concentrée	Mesurer avec la micropipette réglable un volume de 0,3 ml.
Des polymères d'alginate	Mesurer avec la balance une masse de 0,3g.
Ortho silicate de tétraéthyle	Mesurer avec la micropipette réglable un volume de 0,3 ml.
Triéthylène glycol diméthacrylate	Mesurer avec la micropipette réglable un volume de 0,3 ml.

CHAPITRE IMATERIEL ET METHODE

I.2.4 Réalisation du test



- Les œufs sont retirés de l'incubateur le dixième jour pour être utilisés dans le test.
- Les œufs sont examinés à l'aide d'une lampe dans un environnement sombre, et les œufs non viables ou défectueux sont ignorés.
- La chambre à air de l'œuf a été marquée.
- La zone marquée a été copié à l'aide de ciseaux chirurgicaux, puis retiré.
- Il est important de faire preuve de prudence lors du retrait de la coquille de l'œuf pour éviter d'endommager la membrane interne.
- À l'aide d'une micropipette réglable, mesuré volume de 0,3ml de sérum physiologique 0,9% (témoin négative), on la répartit de manière à recouvrir entièrement la membrane CAM.
- À l'aide de micropipette réglable, mesuré volume de 0,3ml de NaOH (témoin positif), on la répartit de manière à recouvrir entièrement la membrane CAM.
- À l'aide de même manière avec tous les produits, pour les liquides on mesure avec la micropipette réglable volume de 0,3ml et pour les solides on mesure avec la balance quantité de 0,3g.
- Toutes les altérations vasculaires sont observées immédiatement avant l'application de la substance de test, et à 0,5 et 2 et 5 minutes après l'exposition, en prenant des photos des altérations avant et après l'apparition des symptômes.
- Les réactions de la membrane CAM, des vaisseaux sanguins et des capillaires sont examinées et les effets irritants sont enregistrés

I.2.5 Observation des effets


Les effets à observer sont résumé dans le tableau suivant :

Tableau 3 Observation des effets.

CHAPITRE IMATERIEL ET METHODE

Effet	Définition	Observation
<p>La lyse</p>	<p>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 (Jorf, 1996).</p>	
<p>Hémorragie</p>	<p>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).</p> <p>Il est à noter que :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 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 (Jorf, 1996). 	
<p>Effet</p>	<p>Définition</p>	<p>Observation</p>

CHAPITRE IMATERIEL ET METHODE

Coagulation	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, ...) (Jorf, 1996).	 Une photographie montrant un œuf cassé dans un carton à œufs. L'œuf est ouvert, et on voit à l'intérieur une membrane interne qui a coagulé, formant une masse rougeâtre et opaque. D'autres œufs sont visibles à l'arrière-plan.
-------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

I.2.6 Mesure des scores d'irritation

La mesure du score d'irritation a été faite en se basant sur le tableau 04

Tableau 4 Notation pour les tests des irritations avec la méthode de teste HET-CAM (Spielmann and Liebsch, 2010)

Effet	Score		
	0.5min	2 min	5 min
La lyse	5	3	1
Hémorragie	7	5	3
Coagulation	9	7	5

CHAPITRE IMATERIEL ET METHODE

I.2.7 Expression des résultats selon la notation

Ce tableau présente la classification d'irritation selon l'échelle de notation.

Tableau 05 : Expression des résultats selon la notation (X.Yan et al, 2007).

Notation (N)	Classification
N inférieures à 1.	Non irritant.
N supérieure ou égale à 1 ou inférieure à 5.	Faiblement irritant.
N supérieure ou égale à 5 ou inférieure à 9.	Moyennement irritant.
N supérieure ou égale 9.	Fortement irritant.

CHAPITRE II :

RESULTATS



CHAPITRE II RESULTATS

II. RESULTATS




II.1 Résultats d'observation

Le tableau montre les produits utilisés et les changements observés dans chaque période de temps avec une conclusion de chaque produit.




Tableau 06 : Les résultats des produits testé.

Produit testé	Observation	Phénomène	Temps d'apparition	Conclusion
Témoins négatif (sérum physiologique)		Lyse Hémorragie Coagulation	00 :00 00 :00 00 :00	Selon les résultats d'observation de l'échantillon de sérum physiologique absence de tous les effets d'irritation.
Témoins positif (NaOH)		Lyse Hémorragie Coagulation	02min00s 02min00s 5min00s	Selon les résultats d'observation de l'échantillon de NaOH présence tous les effets d'irritation.


CHAPITRE II RESULTATS

Produit testé	Observation	Phénomène	Temps d'apparition	Conclusion
HE de lavande concentrée		Lyse Hémorragie Coagulation	02min00s 00min00s 00min00s	Selon les résultats d'observation de l'échantillon d'huile essentielle de lavande absence de tous les effets seulement la lyse.
HE géranium concentrée		Lyse Hémorragie Coagulation	00min30s 00min00s 00min00s	Selon les résultats d'observation de l'échantillon d'huile essentielle de géranium absence de tous les effets seulement la lyse.
HE Teatree Concentrée		Lyse Hémorragie Coagulation	2min00s 05min00s 00min00s	Selon les résultats d'observation de l'échantillon d'huile essentielle Teatree présence de la lyse et l'hémorragie, absence de la coagulation.

CHAPITRE II RESULTATS

Produit testé	Observation	Phénomène	Temps d'apparition	Conclusion
HE Palmarosa concentrée		Lyse Hémorragie Coagulation	00min30s 00min00s 00min00s	Selon les résultats d'observation de l'échantillon d'huile essentielle de Palmarosa absence de tous les effets seulement la lyse.
Des polymères d'alginate		Lyse Hémorragie Coagulation	00min00s 00min00s 00min00s	Selon les résultats d'observation de l'échantillon de polymère d'alginate absence de tous les effets d'irritation.
Ortho silicate de tétra éthyle		Lyse Hémorragie Coagulation	05min00s 00min00s 00min00s	Selon les résultats d'observation de l'échantillon de Ortho silicate de tétra éthyle absence de tous les effets seulement la lyse.

CHAPITRE II RESULTATS

Produit testé	Observation	Phénomène	Temps d'apparition	Conclusion
Triéthylène glycol diméthacrylate		Lyse Hémorragie Coagulation	05min00s 00min00s 00min00s	Selon les résultats d'observation de l'échantillon de TGEDMA absence de tous les effets seulement la lyse.

II.2 Résultats des scores d'irritation

Ce tableau présente les scores finaux avec le degré d'irritation de chaque produit.

Tableau 07 : Présentation des scores finaux selon le degré d'irritation

Produits	Score Lyse	Score hémorragie	Score Coagulation	Score finale	Interprétation
Témoin négatif (sérum physiologique)	0	0	0	0	Non irritant.
Témoin positif (NaOH)	3	5	5	13	Fortement irritant.
HE Lavande concentrée	3	0	0	3	Faiblement irritant.
HE Géranium concentrée	5	0	0	5	Moyennement irritant.
HE Teatree concentrée	3	3	0	6	Moyennement irritant.
HE Palmarosa concentrée	5	0	0	5	Moyennement irritant.
Des polymères d'alginate	0	0	0	0	Non irritant.
Ortho silicate de tétraéthyle	1	0	0	1	Faiblement irritant.
Triéthylène glycol diméthacrylate	1	0	0	1	Faiblement irritant.

CHAPITRE III :

DISCUSSION

III. DISCUSSION

L'objectif de travail est de tester des produits cosmétiques par le test HETCAM.

L'évaluation du potentiel d'irritation oculaire des produits manufacturés, en particulier des produits cosmétiques et de soins personnels, ainsi que de leurs composants, est obligatoire dans la plupart des pays. Les préoccupations économiques, politiques, éthiques et scientifiques ont conduit à considérer les modèles animaux comme non durables. Cela a incité les agences réglementaires de différents pays à développer des tests de remplacement in vitro (développés en laboratoire) (M.N.Rivero et al, 2021) .

Le test HETCAM, l'un des plus anciens et des plus utilisés par rapport au test de Draize, a été évalué dans de nombreuses études de validation montrant une corrélation avec le test oculaire sur les lapins pour l'évaluation des produits cosmétiques.

Basée sur une étude évaluant la précision, la sensibilité et la corrélation directe entre le test CAM et l'évaluation de l'œil humain de manière critique (X.Yan et al, 2007), étude a testé l'irritation du CAM pour divers produits cosmétiques (huiles essentielles, shampooings, crèmes, etc.) en suivant le protocole original du test (N.P.Luepke, 1985). Un protocole clinique standardisé a été développé par le comité de révision institutionnel d'origine.

Après l'application et le test des mêmes substances sur le CAM et les tests oculaires, les réponses inflammatoires ont été examinées pour le CAM ainsi que pour la conjonctive enflée, la conjonctive palpébrale, les vaisseaux sanguins et les larmes à cinq intervalles de temps. Les résultats ont montré que le test CAM est une méthode extrêmement sensible et précise pour évaluer les substances légèrement à modérément irritantes, ainsi que les irritants puissants, où les effets et les réponses du CAM sont similaires à ceux de l'œil humain. Cela confirme que le test HET est un test précis pour l'évaluation de l'irritation des substances et peut être utilisé comme une méthode de remplacement efficace pour réduire les tests oculaires et les tests sur les animaux.

CHAPITRE III DISCUSSION

III.1 Sérum physiologique NaCl 0.9% (témoin négatif)

Le sérum physiologique à 0,9% est une solution saline stérile utilisée couramment en médecine et en soins de santé. Il est composé d'une concentration de chlorure de sodium de 0,9% dans de l'eau purifiée, ce qui lui confère une osmolarité similaire à celle du plasma sanguin humain.

Cette solution est utilisée pour diverses applications médicales, telles que le nettoyage des plaies, l'irrigation des yeux, le lavage nasal, la dilution de médicaments et l'hydratation des tissus. En raison de sa composition similaire à celle du corps humain, le sérum physiologique à 0,9% est bien toléré et n'entraîne généralement pas d'effets indésirables significatifs (W.M.Boek et al, 1999).

Après application de sérum physiologique sur la membrane CAM, elle n'a montré aucun signe même après 5 minutes de son application.

L'objectif de l'utilisation du sérum physiologique 0.9% en tant que contrôle est de vérifier si le test lui-même les conditions d'expérimentation ou d'autres facteurs externes peut provoquer des changements sur la membrane CAM.

Le sérum physiologique est une solution isotone contenant une concentration d'électrolytes similaire à celle du sang (H.Spielmann et al, 1997). Il est couramment utilisé pour le rinçage ou l'hydratation des tissus, et il est considéré comme sûr et bien toléré par les tissus biologiques.

Lorsqu'aucun changement n'est observé avec le sérum physiologique, cela indique que la membrane CAM est stable et qu'elle n'est pas sujette à des réactions indésirables ou à une irritation spontanée. Cela renforce la validité du test en tant que méthode pour évaluer les effets spécifiques des substances testées sur la membrane CAM, cela indique que les conditions expérimentales sont appropriées, que la membrane CAM est saine et que les résultats observés avec d'autres substances testées sont plus susceptibles de refléter les effets spécifiques de ces substances plutôt que des réactions indésirables ou spontanées de la membrane elle-même.

CHAPITRE III DISCUSSION

En conclusion le sérum physiologique est utilisé comme témoin négatif afin de vérifier l'intégrité de la membrane, il a également les mêmes propriétés que le sang, et aucune altération n'a été mise en évidence, ce qui signifie qu'il n'est pas irritant (score finale =0, Non irritant), et un bon témoin de comparaison avec d'autres solutions.

III.2NaOH (Témoin positif)

Le NaOH est l'abréviation de l'hydroxyde de sodium, également connu sous le nom de soude caustique. C'est un composé chimique solide, souvent sous forme de perles ou de flocons, largement utilisé dans l'industrie et en laboratoire.

Le NaOH est un agent alcalin puissant et caustique, couramment utilisé pour la fabrication de produits chimiques, le traitement de l'eau, la production de papier, la fabrication de savon, et dans de nombreux autres processus industriels. Il est également utilisé à des fins de nettoyage et de débouchage des canalisations, bien qu'il doive être manipulé avec précaution en raison de sa nature corrosive (INRS, 2021).

Dans L'expérience de test HET, nous avons utilisé le NaOH 0,1M (hydroxyde de sodium) comme témoin positif pour évaluer la réactivité de la membrane CAM de l'œuf de poule. En fonction des résultats des observations : utilisant le NaOH comme témoin positif dans le test HETCAM ont montré des changements significatifs dans la membrane chorionique des œufs de poule. La lyse s'est produite en 2 minutes, suivie d'une hémorragie en 2 minutes et d'une coagulation en 5 minutes. Le score d'irritation obtenu était de 13.

Ces résultats indiquent que le NaOH a provoqué des effets irritants sur la membrane chorioallantoïdienne. La lyse, l'hémorragie et la coagulation sont des réactions typiques observées lorsqu'un irritant est appliqué sur la CAM. La lyse fait référence à la rupture ou à la dissolution des cellules, tandis que l'hémorragie se réfère à la libération de sang causée par des dommages vasculaires. La coagulation fait référence à la formation de caillots sanguins en réponse à une blessure.

Les composants du NaOH, en particulier les ions hydroxyde (OH⁻), sont responsables des changements excitatoires observés sur le CAM. Lorsque le NaOH est appliqué sur la membrane chorionique, les ions hydroxyde réagissent avec les cellules et perturbent leur équilibre acido-basique. Les ions hydroxyde sont hautement alcalins et ont la capacité d'augmenter le pH de l'environnement cellulaire (N.de version : 4.002, 2019).

CHAPITRE III DISCUSSION

Cette augmentation du pH perturbe l'homéostasie cellulaire et entraîne des dommages aux cellules de la membrane chorionique. Les ions hydroxyde peuvent interagir avec les lipides des membranes cellulaires, provoquant une altération de leur structure et de leur fonctionnement (**N.de version : 4.002, 2019**).

Ces interactions chimiques et physiques entre les ions hydroxyde du NaOH et les cellules de la membrane chorionique entraînent une lyse cellulaire, une hémorragie et une coagulation.

En comparaison avec le témoin négatif qui n'a montré aucun changement ou irritation, le témoin positif (NaOH) a provoqué des changements significatifs dans la membrane chorionique et peut causer des effets néfastes.

La comparaison entre le témoin positif et le témoin négatif renforce la validité des résultats obtenus avec le témoin positif. En obtenant un score d'irritation de 0 pour le témoin négatif, cela renforce la crédibilité des résultats obtenus avec le témoin positif. Les résultats obtenus avec le NaOH dans l'expérience, confirment la sensibilité du test HETCAM pour détecter les effets irritants ou nocifs des substances.

Plusieurs études et évaluations ont été réalisées pour évaluer l'irritation cutanée et oculaire associée à NaOH, Ces études ont généralement conclu que le NaOH a des caractéristiques irritantes très élevée (**K.P.Wilhelm et al, 1990**). Les résultats obtenus sont cohérents avec les connaissances existantes sur les propriétés corrosives et irritantes du NaOH.

Ces résultats confirment donc que le test HETCAM est sensible pour détecter les effets irritants ou nocifs des substances chimiques, en l'occurrence le NaOH dans ce cas.

Cela démontre l'utilité de ce test dans l'évaluation préliminaire de la sécurité des substances et des produits, permettant d'identifier rapidement les substances présentant un potentiel irritant ou nocif pour les tissus (**X.Yan et al, 2007**).

III.3 Huile essentielle de lavande

L'huile essentielle de lavande est extraite à partir des fleurs de lavande, une plante aromatique appartenant à la famille des Lamiacées. Elle est largement utilisée en aromathérapie en raison de ses nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé et le bien-être (M.Lis-Balchin, 2002).

Une des utilisations de cette huile essentielle

- ✓ Relaxation et gestion du stress : L'huile essentielle de lavande est réputée pour ses propriétés relaxantes. Elle peut aider à réduire le stress, l'anxiété et favoriser un sommeil réparateur.
 - ✓ Soins de la peau : L'huile essentielle de lavande est bénéfique pour la peau. Elle possède des propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires qui peuvent aider à apaiser les irritations cutanées, les brûlures légères, les piqûres d'insectes et les éruptions cutanées mineures.
 - ✓ Soulagement des maux de tête : peut être utile pour soulager les maux de tête et les migraines.
 - ✓ Anti-inflammatoire : Elle possède des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent être utiles pour apaiser les douleurs musculaires et articulaires légères.
 - ✓ cicatrisante : L'huile essentielle de lavande peut aider à accélérer le processus de cicatrisation de certaines blessures mineures (U.Wacker et al , 2008).
 - Bien que l'huile essentielle de lavande présente de nombreux avantages, il est également important de connaître certaines de ses limites et précautions d'utilisation :
- Réactions allergiques : Certaines personnes peuvent être sensibles à l'huile essentielle de lavande et peuvent développer des réactions allergiques cutanées telles que rougeurs, démangeaisons ou irritations. Il est recommandé de faire un test de patch cutané avant une utilisation étendue.

CHAPITRE III DISCUSSION

-Irritation cutanée : L'utilisation excessive d'huile essentielle de lavande peut provoquer une irritation cutanée. Il est important de suivre les instructions d'utilisation et de respecter les dosages recommandés (**M.Lis-Balchin, 2002**).

- Les composants les plus importants de l'huile essentielle qui peuvent provoquer une réaction allergique

-Camphre : Bien que présent en faibles quantités dans l'huile essentielle de lavande, le camphre peut également être irritant pour certaines personnes, en particulier à des concentrations élevées (**R.Guba, 2002**).

-Linalol : Le Linalol est l'un des principaux composants de l'huile essentielle de lavande. Bien qu'il soit généralement bien toléré, certaines personnes peuvent être sensibles à cette substance et présenter des réactions allergiques ou d'irritation cutanée (**A.Prashar et al, 2004**).

-Linalyl acétate : Le linalyl acétate est un ester présent dans l'huile essentielle de lavande. Bien qu'il soit responsable de l'odeur caractéristique de la lavande, certaines personnes peuvent présenter une sensibilité à cette substance, ce qui peut entraîner une irritation cutanée (**A.Prashar et al, 2004**).

Sur base de résultat d'observation de l'échantillon d'huile essentielle de Lavande, absence tous les effets seulement la lyse en fonction du temps d'apparition 02min00s et selon le score d'irritation obtenu dans l'échantillon de l'HE est de 3, ce qui indique un degré d'irritation faible.

Et nous expliquons cela par l'intervention d'un des éléments irritant (Campher, Linalol, linalyl acétate) présents dans l'huile essentielle de lavande à forte concentration.

La lyse, qui se produit lorsque l'huile essentielle de lavande provoque une rupture ou une destruction des cellules de la membrane CAM. Dans le contexte du tableau de score d'irritation du test HET-CAM, la lyse peut être considérée comme un effet d'irritation faible (<5, Faiblement irritant).

La lyse, en particulier, peut être classée comme un effet bénin et entraînerait probablement un score faible dans le tableau de score d'irritation. Cela indique que l'huile essentielle de lavande a un faible potentiel irritant après avoir été appliquée à des concentrations élevées.

CHAPITRE III DISCUSSION

En comparant les résultats obtenus avec le témoin négatif et le témoin positif on peut conclure que l'huile essentielle de lavande a provoqué une irritation faible.

Plusieurs études et évaluations ont été réalisées pour évaluer l'irritation cutanée et oculaire associée à l'huile essentielle de lavande. Ces études ont généralement conclu que l'huile de lavande a un profil d'irritation faible à modéré (**M.Lis-Balchin, 2002**).

III.4 Huile essentielle de géranium

L'huile essentielle de géranium est extraite des feuilles et des fleurs de la plante de géranium, scientifiquement connue sous le nom de *palargonium graveolens*.

Elle est prisée dès l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de l'aromathérapie en

Raison de son agréable parfum floral et de ses nombreuses propriétés bénéfiques pour la peau et l'esprit (**R.Tisserand and R.Young, 2013**).

La composition d'HE de géranium est complexe, comprenant un mélange de divers composés chimiques actifs. Parmi ces composés, on trouve des monoterpènes, des sesquiterpènes, des alcools, des esters et des cétones (**R.Tisserand and R.Young, 2013**).

Les principaux composants identifiés dans l'huile de géranium sont le citronellol, le géranol, le linalol, le citronellyl formate, le géranyle formate et le menthone. Ces composés confèrent à l'huile son parfum caractéristique et contribuent à ses propriétés thérapeutiques (**R.Tisserand and R.Young, 2013**).

Le citronellol est connu contre les insectes et le géranol présente des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires, tandis que le linalol est réputé pour ses effets apaisants et relaxants, les esters tels que le citronellyl formate et le géranyle formate, contribuent au parfum floral doux et subtil d'HE de géranium (**R.Tisserand and R.Young, 2013**).

L'huile essentielle de géranium est largement utilisée dans l'industrie cosmétique, elle est utilisée pour ses nombreux bienfaits pour la peau et les cheveux. Elle équilibre la production de sébum, réduit l'acné, les inflammations et les irritations cutanées, tonifie la peau et améliore sa texture. De plus, elle stimule la production de collagène pour réduire les rides. Pour les cheveux, elle renforce, stimule la croissance et prévient les pellicules, apportant brillance et vitalité tout en protégeant contre les dommages.

CHAPITRE III DISCUSSION

Dans l'industrie de la parfumerie, son parfum floral agréable est apprécié, et dans les produits de bain et de spa, elle crée une expérience relaxante et hydratante.

- Bien que l'huile essentielle de géranium présente de nombreux avantages, il est également important de connaître certaines de ses limites et précautions d'utilisation, l'huile essentielle de géranium présente certains inconvénients

Elle peut provoquer des irritations, il est donc recommandé de faire un test cutané préalable et de la diluer avec une huile porteuse (**C.Hilpipre, 2018**).

De plus, elle peut interagir avec certains médicaments, il est donc préférable de consulter un professionnel de la santé avant de l'utiliser, notamment en cas de prise de médicaments.

Les femmes enceintes ou allaitantes doivent prendre des précautions supplémentaires, et certaines sources suggèrent même d'éviter son utilisation pendant cette période. Il faut également faire attention à la photosensibilité de l'huile de géranium, car elle peut augmenter la sensibilité de la peau au soleil, ce qui peut entraîner des réactions indésirables (**C.Hilpipre, 2018**).

Cependant, il est important de noter que le citronellol et le géraniol peuvent également présenter certaines caractéristiques irritantes pour certaines personnes. Ces irritations peuvent se manifester par des rougeurs, des démangeaisons, une sensation de brûlure ou des réactions allergiques cutanées (**J.Lawless, 2002**).

Quant au linalol, il présente généralement un faible risque d'irritation cutanée. Il est bien toléré par la plupart des individus (**J.Lawless, 2002**).

Les esters, tels que le citronellyl formate et le géranyle formate, sont généralement considérés comme bien tolérés par la peau et présentent un risque d'irritation cutanée relativement faible (**J.Lawless, 2002**).

Sur base de résultat d'observation de l'échantillon d'huile essentielle de géranium concentré, absence tous les effets seulement la lyse avec temps d'apparition 00min30s et selon le score d'irritation obtenu dans l'échantillon de l'HE est de 5.

CHAPITRE III DISCUSSION

Un score de 5 correspond généralement à des signes d'irritation tels que la lyse. L'HE de géranium contient divers composés chimique, notamment le citronellol, le géraniol, la linalol et les esters. Bien que ces composés présentent des propriétés bénéfiques, ils peuvent également contribuer à l'irritation cutanée et aux réactions inflammatoires chez certaines personnes sensibles.

La lyse observée peut être attribuée à la concentration élevée d'HE de géranium utilisée. Les composés de ces huiles peuvent avoir des effets cytotoxiques ou perturber l'intégrité de la membrane cellulaire, ce qui peut conduire à la lyse cellulaire. Cela se traduit par une lyse au niveau des vaisseaux sanguins de la membrane CAM.

En comparant les résultats obtenus avec le témoin négatif et le témoin positif on peut conclure que l'huile essentielle de géranium a provoqué une irritation moyenne.

Plusieurs études et évaluations ont été réalisées pour évaluer l'irritation cutanée et oculaire associée à l'huile essentielle de géranium et ces composants. Ces études ont généralement montré que l'huile de géranium provoque une irritation légère à modérée (**T.Poirot, 2016**).

III.5 Le Teatree

L'arbre à thé, également connu sous le nom de Teatree, est un arbuste originaire d'Australie, dont le nom scientifique est *Melaleuca alternifolia*. L'huile essentielle extraite des feuilles de cet arbre est communément appelée huile essentielle d'arbre à thé ou Teatree oil.

L'huile essentielle d'arbre à thé est réputée pour ses propriétés antiseptiques, antifongiques et anti-inflammatoires. Elle a été utilisée traditionnellement par les Aborigènes australiens pour traiter diverses affections cutanées, y compris les infections, les plaies et les piqûres d'insectes (**B.Edited et al, 1999**).

- Une des utilisations de cette huile essentielle
- ✓ Soins de la peau : Elle est souvent utilisée pour traiter l'acné, les plaies, les coupures et les infections fongiques de la peau. On peut l'appliquer directement sur la peau diluée dans une huile végétale ou un gel.
- ✓ Hygiène buccale : Elle est parfois utilisée pour soulager les maux de dents et les infections de la bouche. On peut l'ajouter à de l'eau pour se gargariser ou l'appliquer sur une compresse pour soulager les douleurs dentaires.

CHAPITRE III DISCUSSION

- ✓ Soins des ongles : L'huile essentielle d'arbre à thé peut être utilisée pour traiter les infections fongiques des ongles. Elle peut être appliquée directement sur les ongles affectés (**B.Edited et al, 1999**).
 - Bien que l'huile essentielle de Teatree présente de nombreux avantages, il est également important de connaître certaines de ses limites et précautions d'utilisation :
- ✓ Propriétés antibactériennes : L'huile de Teatree a des propriétés antibactériennes qui peuvent aider à combattre les bactéries responsables de certaines infections cutanées telles que l'acné, les furoncles et les infections fongiques.
- ✓ Soulagement des affections cutanées : L'huile de Teatree peut aider à soulager les démangeaisons, les irritations et les inflammations de la peau, notamment en cas d'eczéma, de psoriasis et de piqûres d'insectes.
- ✓ Risque d'allergies : Certaines personnes peuvent être allergiques à l'huile de Teatree. Il est recommandé de faire un test de patch avant une utilisation plus étendue pour vérifier toute réaction allergique (**Carson.C.F et al, 2006**).
- Certaines composantes de l'HE de Teatree sont responsables de l'apparition de certaines signes d'irritation :
 - ✓ Terpènes : L'huile de Teatree contient des terpènes, tels que le limonène et l'alpha-pinène, qui peuvent causer des irritations cutanées chez certaines personnes sensibles.
 - ✓ Terpiné-4-ol : Le terpiné-4-ol est considéré comme l'un des principaux composés actifs de l'huile de Teatree, responsable de ses propriétés antimicrobiennes. Cependant, il peut également provoquer des irritations cutanées, en particulier à des concentrations élevées.
 - ✓ Cinéole : Le cinéole, également connu sous le nom d'eucalyptol, est un autre composant de l'huile de Teatree. Bien qu'il ait des propriétés bénéfiques, il peut également être irritant pour certaines personnes (**katherine.A.H et al, 2012**).

Sur base de résultats d'observations de l'échantillon de L'HE de thé (Teatree), apparition de la lyse dans le 2min 00s et l'hémorragie dans le 5min et 00s et selon le score d'irritation

CHAPITRE III DISCUSSION

obtenu dans l'échantillon de l'HE de thé est 6, ce qui indique un degré d'irritation moyenne un score d'irritations 6 correspond généralement à des signes d'irritation tels que la lyse et l'hémorragie.

Ce qui indique la présence d'une la lyse à certains effets irritant en termes de composants entrant dans la composition de l'huile de Teatree et l'apparition de saignements indiquant que le Terpiné-4-ol (est considéré comme un composant entrant dans la composition de l'arbre à thé), provoque une irritation lorsqu'il est utilisé à des concentrations élevées, Il indiquées que le TTO est toxique s'il est pris à des doses plus élevées et peut également provoquer une irritation cutanée à des concentrations plus élevées (**K.A.Hammer et al, 2005**).

En comparant les résultats obtenus avec le témoin négatif et le témoin positif on peut conclure que l'huile essentielle de Teatree a provoqué une irritation moyenne.

Plusieurs études et évaluation ont été réalisées pour évaluer l'irritation associée à l'huile essentielle de Teatree et ces composants. Ces études ont généralement montré que l'huile de Teatree provoque une irritation moyenne (**S.Keyur et al, 2019**).

III.6 Palmarosa

L'huile de Palmarosa est une huile essentielle obtenue par distillation à la vapeur des feuilles de la plante *Cymbopogon martini*. Elle a une couleur jaune pâle à ambre et un arôme floral doux et agréable, rappelant la rose. Elle contient des composés actifs tels que le géraniol, le linalol et le citronellol (**SO BIO étic, 2018**).

- Une des utilisations de cette huile essentielle
- ✓ Soins de la peau : L'huile de Palmarosa est connue pour ses propriétés bénéfiques pour la peau. Elle peut être utilisée dans les produits de soins de la peau tels que les crèmes, les lotions et les savons. Elle est souvent utilisée pour ses propriétés régénérâtes, hydratantes et antiseptiques. Elle peut aider à équilibrer la production de sébum, apaiser les irritations cutanées et favoriser une peau saine
- ✓ Parfumerie : En raison de son arôme floral et agréable, l'huile de Palmarosa est utilisée dans l'industrie de la parfumerie pour apporter une note de rose ou de géranium aux parfums.

CHAPITRE III DISCUSSION

- ✓ Désodorisant naturel : En raison de son parfum agréable, l'huile de Palmarosa peut être utilisée comme désodorisant naturel pour éliminer les odeurs indésirables dans la maison ou dans l'air ambiant (**SO BIO étic, 2018**).
- Bien que l'huile essentielle de Palmarosa présente de nombreux avantages, il est également important de connaître certaines de ses limites et précautions d'utilisation :
- ✓ Régulation du sébum : L'huile de Palmarosa est souvent utilisée pour aider à réguler la production de sébum de la peau, ce qui peut être bénéfique pour les personnes ayant une peau grasse ou sujette à l'acné.
- ✓ Propriétés antifongiques : Elle peut également avoir des propriétés antifongiques qui aident à combattre les infections fongiques, telles que les mycoses des ongles ou le pied d'athlète.
- ✓ Sensibilité individuelle : Comme pour toute huile essentielle, certaines personnes peuvent être sensibles ou allergiques à l'huile de Palmarosa. Il est important de faire un test de patch avant une utilisation plus étendue pour vérifier toute réaction indésirable (**Mishra and Kehri, 2012**).
- Certaines composantes de l'HE de Palmarosa sont responsables de l'apparition de certaines signes d'irritation :
 - Géraniol : Le géraniol est un composé courant présent dans de nombreuses huiles essentielles, y compris l'huile de Palmarosa. Bien qu'il ait de nombreuses propriétés bénéfiques, il peut être irritant pour certaines personnes, en particulier s'il est utilisé à des concentrations élevées.
 - Citronellol : Le citronellol est également un composant présent dans l'huile de Palmarosa. Il peut provoquer des réactions allergiques chez certaines personnes sensibles.
 - Farnésol : Le Farnésol est un autre composé présent dans l'huile de Palmarosa qui peut être irritant pour la peau, en particulier lorsqu'il est utilisé à des concentrations élevées (**A.Prashar et al, 2016**).

CHAPITRE III DISCUSSION

Sur base de résultat d'observation de l'échantillon de l'huile essentielle de Palmarosa, absence de tous les effets seulement la lyse en fonction de temps d'apparition 00min 30s et selon le score d'irritation obtenu dans l'échantillon de l'HE Palmarosa est de 5, ce qui indique un degré d'irritation moyenne.

L'absence de tous les effets seulement la lyse dans le temps de 30 sec, ce qui indique l'absence d'effet irritant important du l'HE de Palmarosa sur la membrane chorioallantoïque des œufs de poule incubés. Cela suggère que le Palmarosa a une moyenne potentielle d'irritation lorsqu'il est appliqué sur la membrane CAM. Les résultats indiquent que le HE utilisé n'a pas provoqué de saignement ni de coagulation sur la membrane chorioallantoïque ce qui suggère une moyenne irritabilité. Cependant, la présence de la lyse peut indiquer une certaine action sur la membrane, l'huile de Palmarosa comprend dans sa composition un groupe de composants qui ont conduit à une lyse, parmi ces composés le géraniol, le linalol et le citronellol, qui peuvent être à des concentrations élevées qui ont conduit à l'apparition de réactions, notamment au contact des yeux.

En comparant les résultats obtenus avec le témoin négatif et le témoin positif on peut conclure que l'huile essentielle de Palmarosa a provoqué une irritation moyenne.

Plusieurs études et évaluation ont été réalisées pour évaluer l'irritation associée à l'huile essentielle de Palmarosa et ces composants. Ces études ont généralement montré que l'huile de Palmarosa provoque une moyenne irritation (**P.Janhvi et al, 2015**).

III.7 Les polymères d'alginate

Les alginates sont des polymères naturels dérivés de l'acide alginique, principalement extrait des algues brunes. Ils sont composés de répétitions d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique, formant des chaînes linéaires liées par des liaisons glycosidiques.

Les alginates sont solubles dans l'eau et forment des gels en présence de cations divalents tels que le calcium, grâce à la formation de ponts chimiques. Ces propriétés de gélification sont utilisées dans diverses industries comme agents épaississants, gélifiants et stabilisants, notamment dans l'alimentation, la pharmaceutique et la cosmétique (**K.I.Draget et al, 2005**).

CHAPITRE III DISCUSSION

Les alginates présentent également des propriétés intéressantes, telles que leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et leur capacité à former des complexes avec certains médicaments et protéines. Ces caractéristiques en font des matériaux polyvalents dans le domaine biomédical, notamment pour la fabrication de pansements, d'emplâtres, de matrices de libération de médicaments, de supports pour la culture cellulaire (**K.I.Draget et al, 2005**).

Les polymères d'alginate sont utilisés dans l'industrie cosmétique pour une variété d'applications, allant des masques faciaux aux produits capillaires et aux produits pour le bain. Les masques faciaux à base d'alginate sont appréciés pour leur capacité à hydrater, apaiser et améliorer l'éclat du teint, tandis que les gommages et exfoliants contenant des particules d'alginate offrent une solution douce et efficace pour éliminer les cellules mortes de la peau, la rendant plus douce et plus lisse (**H.H.Tonnesen et J.Karlsen, 2002**).

Les polymères d'alginate présents dans les produits de soins capillaires hydratent, revitalisent et renforcent les cheveux, améliorant leur brillance et leur santé (**J.Sun et H.Tan, 2013**).

Les alginates sont utilisés dans les produits de maquillage pour améliorer la texture, faciliter l'application et obtenir une couvrance uniforme et naturelle. Ils sont également présents dans les produits pour le bain, apportant une texture agréable, apaisant la peau et aidant à prévenir la déshydratation, offrant une sensation de confort et de douceur pendant le bain (**H.H.Tonnesen et J.Karlsen, 2002**).

Les propriétés uniques des polymères d'alginate et leur compatibilité avec la peau en font des ingrédients polyvalents et appréciés par les fabricants de produits cosmétiques (**H.H.Tonnesen et J.Karlsen, 2002**).

Sur base de résultat d'observation de l'échantillon de polymères d'alginates, Absence de tous les effets et selon le score d'irritation obtenu dans l'échantillon de polymères est de 0, ce qui indique l'absence de tout signe d'irritation cutanée et oculaire ou d'effet néfaste sur la membrane chorioallantoïdienne.

Un score d'irritation de 0 est généralement considéré comme un résultat favorable, signifiant que le matériau testé n'a pas provoqué d'irritation ou d'effet indésirable.

Le résultat est prometteur car ils indiquent que les polymères testés à une concentration n'ont pas provoqué d'irritation sur la membrane CAM.

CHAPITRE III DISCUSSION

La comparaison entre le témoin négatif et les polymères d'alginate, cela suggère que les polymères ont présente une réaction similaires à celle du témoin négatif que ne provoque aucune irritation sur la membrane CAM. La comparaison entre le témoin positif et les polymères d'alginate ne provoque aucune irritation sur la CAM, tandis que le témoin positif à monter tous les signes d'irritation.

De nombreuses études et expériences ont été menées pour évaluer l'irritation et la réaction immunitaire des alginate, qui ont montré que les polymères d'alginate ne provoquent pas d'irritation cutanée ni oculaire, et n'induisent pas non plus de réaction immunitaire. Cela les rend candidates à être utilisées comme alternatives dans la culture cellulaire en raison de leur capacité à régénérer différents tissus (**E.Vincent, 2010**).

III.8 Triéthylène glycol diméthacrylate (TEGDMA)

Le triéthylène glycol diméthacrylate (TEGDMA) est un composé chimique utilisé principalement dans l'industrie des matériaux polymères et de la dentisterie. Il appartient à la famille des diméthacrylates et est dérivé du triéthylène glycol (**Meyer**).

Il présente plusieurs utilisations et applications, notamment :

- ✓ Matériaux dentaires : Le TEGDMA est couramment utilisé dans la fabrication de résines dentaires et de composites dentaires. Il est utilisé comme monomère réticulant pour former des réseaux polymères solides, contribuant ainsi à la résistance et à la stabilité des matériaux dentaires.
- ✓ Adhésifs dentaires : Le TEGDMA est également utilisé dans la formulation d'adhésifs dentaires. Il aide à améliorer l'adhérence entre les matériaux dentaires et les structures dentaires, favorisant ainsi la rétention et la durabilité des restaurations dentaires.
- ✓ Matériaux de revêtement : En raison de ses propriétés de polymérisation et de réticulation, le TEGDMA est utilisé dans les formulations de revêtements protecteurs pour divers substrats, tels que les métaux, les plastiques et les bois.
- ✓ Applications biomédicales : En raison de sa biocompatibilité, le TEGDMA est étudié pour une utilisation potentielle dans des applications biomédicales telles que les systèmes de libération de médicaments et les supports de régénération tissulaire (**J.Kenneth et al, 2003**).

CHAPITRE III DISCUSSION

- Bien qu'il ait des avantages, mais s'il est utilisé dans le mauvais sens, il en résulte de nombreux inconvénients
 - ✓ Irritation et sensibilisation cutanée : Le TEGDMA peut causer une irritation cutanée chez certaines personnes sensibles. Il est important de prendre des mesures de protection appropriées lors de la manipulation de ce produit chimique **(J.Kenneth et al, 2003)**.
 - ✓ Potentiel de libération de monomère non polymérisé : Lors de la polymérisation du TEGDMA pour former des matériaux dentaires ou d'autres produits, il peut y avoir un potentiel de libération de monomère non polymérisé. Cela peut présenter des préoccupations en termes de biocompatibilité et de toxicité potentielle **(H.Schweikl et al, 2006)**.
 - ✓ Effets sur la polymérisation et la stabilité : Le TEGDMA peut présenter des défis lors de la polymérisation et de la stabilité des matériaux. Des conditions de polymérisation appropriées doivent être respectées pour assurer une réticulation complète et une performance optimale du matériau final **(J.Kenneth et al, 2003)**.
 - ✓ Toxicité potentielle : Bien que le TEGDMA ait été largement utilisé dans l'industrie dentaire, des préoccupations subsistent quant à sa toxicité potentielle, en particulier à des concentrations élevées ou en cas d'exposition prolongée **(H.Schweikl et al, 2006)**.

Il est important de noter que les limites et préoccupations liées au TEGDMA peuvent varier en fonction des conditions d'utilisation spécifiques, de la concentration, de la durée d'exposition, des formulations et d'autres facteurs.

Sur base de résultat d'observation de TEGDMA, la présence de la lyse en 05min00s et l'absence d'autres effets et selon le score d'irritation obtenu dans ce produit est de 1, ce qui indique un degré d'irritation très faible. Selon l'échelle de notation du test HET-CAM.

La présence de la lyse s'explique lorsque le TEGDMA polymérise, il se transforme en un polymère solide et stable, ce qui réduit son potentiel d'irritation. Cependant, lorsqu'il est en contact avec des liquides biologiques, tels que la salive ou le sérum, le TEGDMA peut se dégrader ou être hydrolysé, produisant des composés potentiellement irritants.

CHAPITRE III DISCUSSION

L'un des principaux composants irritants issus de la dégradation du TEGDMA est l'acide méthacrylique (MAA). L'acide méthacrylique peut être formé par hydrolyse ou dégradation du TEGDMA, et il est connu pour provoquer une irritation cutanée et des réactions allergiques chez certaines personnes sensibles (V.Landuyt et al, 2007).

Il est important de noter que la sensibilité individuelle peut varier, et que toutes les personnes ne réagiront pas de la même manière aux composés issus de la dégradation du TEGDMA. Des études supplémentaires ont été menées pour évaluer les produits de dégradation du TEGDMA et leur potentiel d'irritation spécifique (V.Landuyt et al, 2007).

En comparant les résultats obtenus avec le témoin négatif et le témoin positif on peut conclure que le TEGDMA a provoqué une irritation très faible.

Des études ont été réalisées pour évaluer la sensibilité au TEGDMA, notamment dans le domaine de la dentisterie où il est largement utilisé. Ces études incluent des tests in vitro et des études cliniques pour évaluer les réactions allergiques et les irritations cutanées associées au TEGDMA (N.de révision 2.05, 2020).

III.9 Orthosilicat tétra éthyle (TEOS)

L'ortho silicate tétra éthyle (TEOS) est un composé chimique de formule $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$. Il s'agit d'un liquide incolore, volatil et inflammable qui réagit avec l'humidité de l'air pour former du dioxyde de silicium (SiO_2) et de l'éthanol (Sales, 17 juin 2022).

Il présente plusieurs utilisations et applications, notamment :

- ✓ Restaurations dentaires : L'ortho silicate tétra éthyle peut être utilisé comme précurseur dans la fabrication de matériaux dentaires à base de silice. Il peut être incorporé dans des composites dentaires pour améliorer leurs propriétés physiques, telles que la résistance et la durabilité.
- ✓ Ciments dentaires : Le TEOS peut être utilisé dans la formulation de ciments dentaires, tels que les ciments de verre ionomère, les ciments à base de silicate et les ciments résine-modifiés. Il peut contribuer à la formation de liaisons chimiques entre le matériau de ciment et la surface dentaire, assurant ainsi une adhérence et une stabilité accrues.

CHAPITRE III DISCUSSION

- ✓ Revêtements et adhésifs : L'ortho silicate tétra éthyle peut également être utilisé dans la fabrication de revêtements dentaires et d'adhésifs dentaires. Il peut aider à améliorer l'adhésion entre différents matériaux dentaires, tels que les restaurations et les surfaces dentaires naturelles (**Sales, 17 juin 2022**).
- Bien que le TEOS présente de nombreux avantages, il est également important de connaître certaines de ses limites et précautions d'utilisation :
- ✓ Esthétique : L'orthosilicate tétraéthyle peut être utilisé pour préparer des matériaux dentaires translucides et esthétiques, ce qui permet d'obtenir des restaurations dentaires qui se fondent de manière naturelle avec les dents environnantes.
- ✓ Temps de polymérisation : Le temps de polymérisation de l'orthosilicate tétraéthyle peut être relativement long, ce qui peut entraîner une durée de traitement prolongée lors de l'utilisation de ce matériau pour les restaurations dentaires.
- ✓ Coût : L'orthosilicate tétraéthyle peut être relativement coûteux par rapport à d'autres matériaux de restauration dentaire disponibles sur le marché. Cela peut affecter le coût global des traitements dentaires utilisant ce matériau (**Ch.Young et al, 2009**).

Certaines composantes d'orthosilicate tétraéthyle sont responsables de l'apparition de certains signes d'irritation :

Silicate d'aluminium : Il existe de nombreux types de silicate d'aluminium, tels que la kaolinite, la montmorillonite, l'illite et la muscovite. Il contient du silicium, de l'aluminium et de l'oxygène, en plus d'autres éléments tels que le fer, le magnésium, le potassium et le sodium, qui peuvent provoquer des irritations lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations élevées (**Derek and Jones, 1998**).

Sur base de résultat d'observation de l'échantillon de TEOS, absence de tous les effets seulement la lyse avec un temps d'apparition de 5min 00s et selon le score d'irritation obtenu dans l'échantillon de TEOS est de 1, ce qui indique un degré d'irritation faible. Les résultats indiquent que le TEOS utilisé en dentisterie n'a pas provoqué de saignement ni de coagulation sur la membrane chorioallantoic, cependant, la présence de la lyse peut indiquer une certaine action du TEOS sur la membrane. Le TEOS est principalement composé de tétraéthyle ortho silicate, qui est une forme organique du silicate de tétra éthyle.

CHAPITRE III DISCUSSION

La présence de silicate provoquer une irritation, en particulier lorsqu'il entre en contact direct avec les yeux ou la peau (Sales, 17 juin 2022).

Le silicate de tétra éthyle (TEOS) peut provoquer la lyse des membranes biologiques sensibles en réagissant avec leurs constituants, perturbant ainsi la structure cellulaire et entraînant leur rupture. Des processus chimiques tels que l'hydrolyse et la polymérisation peuvent endommager les membranes cellulaires et provoquer la lyse. La rapidité de la lyse observée dépend de la concentration et de la durée d'exposition au TEOS, avec des concentrations plus élevées et des expositions plus longues entraînant des effets plus prononcés.

En comparant les résultats obtenus avec le témoin négatif et le témoin positif on peut conclure que l'orthosilicate tétra éthyle a provoqué une irritation faible.

Plusieurs études et évaluation ont été réalisées pour évaluer l'irritation associée de orthosilicate tétraéthyle et ces composants. Ces études ont généralement montré que l'orthosilicate tétraéthyle provoque une faiblement irritation (L.Ernawati et al, 2017).

CONCLUSION

CONCLUSION

Notre étude a été effectuée pour tester des produits dans la plupart sont à utilisation cosmétique pour irritation, pour cela nous avons utilisé le test de HETCAM, les résultats ont montré que les produits ont des scores différents, irritabilité faible à modère et au même temps en testant un témoin négatif et un témoin positif pour la validation de test.

Il convient de noter que bien que le test HETCAM soit un outil sensible pour détecter les effets irritants, il ne peut pas remplacer entièrement d'autres méthodes d'évaluation de la sécurité, telles que les études in vivo chez les animaux ou les tests sur des modèles cellulaires spécifiques. Cependant, il offre une approche alternative, rapide et éthiquement acceptable pour l'évaluation initiale des substances potentiellement irritantes ou nocives.

REFERENCES

REFERENCES

A

- A.Bensakhria.2018, avril 22.** Toxicité analytique. Récupéré sur Toxicologie Analytique et l'histoire : <https://www.analyticaltoxicology.com>
- A.K.Mishra and H.K.Kehri.2012.** Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) as a Potential Source of Essential Oil in India: A Review. *J. Herbs, Spices Med. Plants* 18, 129-147.
- A.M.Cimpean et al.2008.**The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis* (11), 311-319.
- A.Prashar, I.C.Locke and C.S.Evans.2004.** Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*, 37(3), 221-229.
- A.Prashar, P.Hili, R.Veness and Ch.Evans 2016.** Antimicrobial action of Palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *National Library of Medicine*.
- A.S.Kishore et al.2008.**Hen Egg Chorioallantoic Membrane Bioassay: An In Vitro Alternative to Draize Eye Irritation Test for Pesticide Screening. *International Journal of Toxicology*, 27, 449-453.
- Académie national de pharmacie.29 juin 2017.** Protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Académie des sciences, institue de France.
- Anderson, D.1990.** In Vitro Models Drug Safety. 5-48.
- ANSM.2016, juin.** Reglementation des produits cosmetiques. Récupéré sur Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé : <https://ansm.sante.fr>
- Arthur Clark, J. M.2017.** The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction. *British Journal of Nutrition*, S1–S7.

B

- B.Edited, R.Southwell, Lowe.1999.** Dans S. Edited Byian, & L. Robert, *Tea Tree* (p. 274). London.
- B.M.Kenzie et al.2015.**The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel:

REFERENCES

Quantification using photoshop and imageJ. International Journal of Pharmaceutics 490, 1-8.

C

C.D.Klaassen.2018. Casarett and Doull's Toxicology. Dans Curtid.D.Klaassen, The Basic Science of Poisons 9th Edition. New York : McGraw-Hill Education.

C.Debbasch et al.2005. Eye irritation of lox-irritant cosmetic formulation: correlation of in vitro results with clinical data and product composition. Food and Chemical Toxicology 43, 155-165.

C.Hilpipre.2018, juin. Huile essentielle de géranium rosat. Récupéré sur Passport santé : <https://www.passeportsante.net>

Carson.C.F, Hammer.K.A and Riley.T.V.2006. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical Microbiology Reviews, 50-62.

Ch.Pachoulide.2021. Les méthodes in silico dans la recherche pharmaceutique. Exemple d'application pour l'étude pharmaceutiques post-autorisation de mise sur le marché des β -bloquants utilisés pour le traitement du glaucome. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en pharmacie, Université de Limoges, Faculté de pharmacie.

Ch.young, J.C.Koi, Lebeau, G.Nunokawa.2009. Effect of a new dental adhesive system on the fracture resistance of porcelain laminate veneers. J Esthet Restor Dent., 380-391.

CSST.2004. Notion de toxicologie. Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Québec, 8-33.

E

E.Vincent.2010. Les Alginates et Leurs Applications en Pharmacie et en Ingénierie Application à La Construction d'un Biomatériau, Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat, Université Henri Poincaré, Faculté de Pharmacie.

REFERENCES

F

Francopa.2010. Etat des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale. Groupement d'intérêt scientifique, 18-22.

FRANK, C.1991. Toxicologie. onnée générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. , 1-131.

G

G.Gallezot.2002. La recherche in silico. Les cahiers du numérique3(Vol3), 121-136.

H

H.H.Tonnesen et J.Karlsen.2002.Alginate in Drug Delivery Systems. Drug Development and Industrial Pharmacy, 28(6), 621-630.

H.L.Spielmann.1997. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation potential of cosmetic formulations and ingredients. *Journal of Applied Toxicology*, 17(2), 255-266.

H.Schweickl, G.Spagnuolo, G.Schmalz.2006. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of Dental Research*, 85(10)., 870-877.

I

I.D.Rupenthal et al .2011.Comparaison of ion-activated in situ gelling systems for ocular drug delivery. Part 2: Precorneal retention and in vivo pharmacodynamic study. *International Journal of Pharmaceutics*, 78-85.

I.Tahir.2021, Décembre 04. Le Centre Algerien du Controle de la Qualité et de l'Emballage. Récupéré sur SCRIBD: <https://fr.scribd.com>

ICCVAM.2006. In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives. ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT.

INRS.2021, avril. Hydroxyde de sodium et solution aqueuses (FT20) généralités. Récupéré sur INRS : <https://www.inrs.fr>

Institutions et autres organes de l'UE. (s.d.). Récupéré sur site web officiel de l'union Européenne : <http://europa.eu/about-eu/institutions-bodies/indexfr/htm>

REFERENCES

J

J.Kenneth, PH.D.Anusavice, DMD et al.2003. PHILLIPS' SCIENCE OF DENTAL MATERIALS. Dans P. D. Kenneth J. Anusavice. USA: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.

J.Lawless.2002. Encyclopedia of Essantials Oils: The Complete Guide to The Use Aromatic Oils in Aromatherapy, Health and well-Being. Dans Julia.Lawless, Encyclopedia of Essantials Oils: The Complete Guide to The Use Aromatic Oils in Aromatherapy, Health and well-Being. Lyon: Thorsons.

J.Sun et H.Tan.2013.Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Application. Materials 6, 1285-1309.

John.M and Frazier.Ph.D.1990.Critetes scintifiques de validation d'essai in VITRO. ORGANISATION DE COOPERATION ET DE DEVELEPPOMENT ECONOMIQUES.

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

K

K.A.Hammer, C.F.Carson, T.V.Riley, J.B.Nielsen.2005.A review of the toxicity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. National Libray Of Medicine.

K.I.Draget, O.Smidsrod, G.Skjak-Braek .2005. Alginates from algae. Récupéré sur Wiley-VCH : <https://application.wiley-vch.de>

K.P.Wilhelm, F.Pasche, C.Surber, M.I.Maibach.1990.Sodium hydroxide-induced subclinical irritation. A test for evaluating stratum corneum barrier function. Acta Derm Venereol, 463-467.

Katherine, A.H, Carson, T.V and Christine. F.2012. Effects of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 909-915.

REFERENCES

L

L.Ernawati, R.Balgis et al.2017. Tunable Synthesis of Mesoporous Silica Particles with Unique Radially Oriented Pore Structures from Tetramethyl Orthosilicate via Oil-Water Emulsion Process. National Library of Medicine.

LEUPKE et KEMPER.1986. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. Food Chemical Toxicology vol24, 495-496.

L'USINE NOUVELLE.2019, mai 8. Dans la pharmacie et la cosmétique, de la simulation à tous les étages. Récupéré sur L'Usine nouvelle : <https://www.usinenouvelle.com>

M

M.Lis-Balchin.2002.Lavender The genus Lavandula. Dans D. R. Hardman, Lavender (p. 155). London and New York.

M.N.Rivero et al.2021.Comparaison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition. Food and Chemical Toxicologie,153.

Medicament.ooreka. (s.d). Récupéré sur serum-physiologique : <https://medicament.ooreka.fr/astuce/voir/562235/serum-physiologique>

Meyer, j.-M. (s.d). TEGDMA et Bisphénol-A meme niveau de risque en médecine dentaire, Genève, université de Genève.

Ministère du commerce.1997, Janvier 15. Décret n°97-37 du 5 Ramadhan 1417 correspondant du 14 janvier 1997 définissant les condition et les modalités de fabrication, de conditionnement, d'imporatation et de commercialisation sur le marché national des produits cosmétiques et d'hygiénecorporelle. Journal offeial de la République Algérienne N°4, p. 15.

Ministère du commerce.2010, Avril 21. Décret exécutif n°10-113 du 3journada Eoula 1431 correspondant au 18 avril 2010 modifiant la répartition par secteur des déoenses d'équipements de l'Etat pour 2010. Article8. Journal offeial de la République Algérienne N°26, pp. 6-7.

REFERENCES

Mr, M.2010. Le test des comètes. Biotechnologie.

N

N.de version : 4.002.2009, Avril 04. Fiche de données de sécurité hydroxyde de sodium. Récupéré sur Mon-Droguiste.com : <https://www.mon-droguiste.com>

N.P.Luepke.1985. HEN4S EGG CHORIOALLNTOIC MEMBRANE TEST FOR IRRITATION POTENTIAL. Food and Chemical Toxicology, 287-291.

N.de version : 2.05.2020, Janvier 13. Fiche de données de sécurité. Récupéré sur GEO SPECIALTY CHEMICALS :[https://www.geosc.com/Assets/Files/MSDS-Files/BISOMER-TEGDMA-\(1\)/SDS-745792-BISOMER-TEGDMA-CLPS-FR.pdf](https://www.geosc.com/Assets/Files/MSDS-Files/BISOMER-TEGDMA-(1)/SDS-745792-BISOMER-TEGDMA-CLPS-FR.pdf)

O

OCDE N° 402.9 octobre 2017. Toxicité cutanée Aigue, 1-4.

OCDE N° 405.14 juin 2021. Test d'irritation / corrosion oculaire, 1-3.

OCDE N° 432.13 avril 2004. Essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU, 1-2.

OCDE N° 438.14 juin 2021. Test d'Irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué, 1-4.

OCDE N° 438.25 juin 2018.Test sur œil de poulet isolé (OPI), 1-15.

OCDE N° 471.21 juillet 1997.Test d'Âmes mutation reverse sur bactéries, 1-4.

OCDE N° 473.29 juillet 2016. Test d'aberration chromosomique in vitro sur cellules de mammifère, 1-3.

OCDE N° 476.29 juillet 2016.Test de mutation génique sur cellules de mammifère, 1-2.

OCDE N° 479.1986.Test d'échange de chromatides-sœurs, 1-4.

OCDE N° 489.29 juillet 2016. Test des Comètes in vivo en Conditions Alcalines sur Cellules de Mammifères, 1-4.

OECD N°437.2008. The Bovine Coreneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritatnts.

REFERENCES

P

P.Budai et al.2010. HET-CAM test for determining the possible eye irritation of pesticides. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 58(3), 369-377.

P.Janhvi, CH.Sukhmalet et al.2015.Palmarosa [*Cymbopogon 76artini* (Roxb). WATS]. As a putative crop for phytoremediation, in tannery sludge polluted soil. National Library of Medicine.

P.Nowak-Sliwinska et al.2014. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 779-804.

R

R.Guba.2002. *Essential Oils and Aromatic Plants: Basic and Clinical Pharmacology* (2nd ed). CRC Press, 327.

R.Lambert.2013. L'importance de L'approcheQualité dans La Mise en Place etLa Realisation d'un ProjetPharmaceutique : Exemple d'Application des Méthodes d'Amélioration Continue pour Affiner la Traçabilité des Produits sur un Site Dépositaire Pharmaceutique, Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat, Université de Lorraine,Faculté de pharmacie.

R.Tisserand and R.Young.2013. *Essential Oil Safety: A guide for Health Care Professionals*. Dans R. T. Young, *Essential Oil Safety: A guide for Health Care Professionals*. London : Elsevier Health Sciences, 2nd ed.

S

S.Dragland.2013, October 29. HET-CAM test. Récupéré sur NIOM : <https://niom.no/het-cam-test/>

S.Festing and R.Wilkinson.2007. The ethics of animal research. *Talking Point on the use of animals in scientific research*. *EMBO reports*, 8(6), 526-530.

S.Keyur, J.T Le, Andrew D Pucker.2019. Tea tree oil for Demodex blepharitis. National Libray of Medicine.

Sales.17 juin 2022. À quoi sert l'orthosilicate de tétraéthyle. *Bloomtech*.

REFERENCES

SO BIO étic.2018.*HUILE ESSENTIELLE PALMAROSA*, 1-12.

Spielmann and Liebsch.2010. Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method . *ICCVAM-Recommended Test Method Protocol* .

T

T.I.Valdes et al.2002.The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* 62(2), 273-282.

T.Poirot.2016.*Bon Usage des Huiles Essentielles, Effets Indiserables et Toxicologie*, Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie.

U

U.Wacker, Ch.Fotsch, Susan.2008. Connaissance des herbes. *EGK Caisse de Santé*, 1-3.

V

V.Landuyt, K.L.Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., ..&Van Meerbeek, B 2007. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28(26),, 3757-3785.

W

W.Derek & Jones.1998. Biomatériaux composites dentaires. *J Can Dent Assoc*.

W.M.Boek, N.Keleş, K.Graamansand E.H.Huizing.1999. Physiologic and hypertonic saline solutions impair ciliary activity in vitro. *The Laryngoscope*, 109(3), 396–399.

W.Steiling et al.1999. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulation and Ingredients. *Toxicologie in Vitro* 13, 375-384.

REFERENCES

X

X.Yan et al.2007. Evaluation of the Hen's Egg test chorioallantonic membrane (CAM) method in prediction of the Eye irritation potential formulated personal Wash products. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 26, 25-36.

Année universitaire : 2022-2023

**Présenté par : DJADAOUN Bouthaina
MEGUELLATI Aya
NASRI Fatima Zohra**

La toxicité locale in vitro : Het-Cam test.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en TOXICOLOGIE

Résumé

L'utilisation de produits cosmétiques a beaucoup augmenté ces dernières années pour répondre à l'exigence de la beauté du monde actuel, ce qui a entraîné une inondation du marché par les composés chimiques dont la sécurité doit être vérifiée. Les tests de toxicité sont devenus essentiels pour évaluer ces produits, les tests traditionnels coûteux, nécessitent le développement de méthodes alternatives plus simples, rapides et économiques. Le test HETCAM utilisant la membrane d'œufs de poulet incubés est devenu une méthode préférée pour évaluer la toxicité de produits chimiques et cosmétiques.

L'objectif de ce travail est de tester le pouvoir d'irritation de quelques produits cosmétiques en utilisant le HETCAM test.

Pour réaliser ce test on a utilisé 29 œufs embryonnés incubé à 37°C pendant 10 jours, on a testé un témoin négatif (le sérum physiologique 0,9%) et un témoin positif (NaOH) et nos produits, les résultats sont interprétés par rapport à une échelle d'irritation. Nous avons constaté que les produits testés variaient entre irritation moyenne et une irritation légère.

On conclue que le test HETCAM a permet de classer les substances selon leur pouvoir d'irritation. Cette approche offre des avantages significatifs tels que des résultats rapides, des coûts réduits et une approche éthique. En soulignant l'importance de remplacer les tests sur les animaux et les diagnostics cliniques chez l'homme

Mots clés : Test HETCAM, test alternative, une échelle d'irritation, tests sur les animaux, signification clinique, sécurité des produits, évaluation de toxicité.

Abstract

The use of cosmetic products has greatly increased in recent years to meet the demand for beauty in today's world, which has led to the flooding of the market with chemical compounds whose safety must be verified. Toxicity tests have become essential to evaluate these products, expensive traditional tests require the development of simpler, faster and more economical alternative methods. The HETCAM test using the membrane of incubated chicken eggs has become a preferred method for assessing the toxicity of chemicals and cosmetics.

The objective of this work is to test the irritant power of some cosmetic products using the HETCAM test.

To carry out this test, we used 29 embryonated eggs incubated at 37°C for 10 days, we tested a negative control (0.9% physiological serum) and a positive control (NaOH) and our products, the results are interpreted by against an irritation scale. We found that the products tested varied between moderate irritation and mild irritation.

It is concluded that the HETCAM a test makes it possible to classify substances according to their irritant power. This approach offers significant advantages such as rapid results, reduced costs and an ethical approach. Highlighting the importance of replacing animal testing and clinical diagnostics in humans.

Keywords: HET-CAM test, alternative test, irritation scale, animal testing, clinical significance, product safety, toxicity evaluation.

ملخص

ازداد استخدام مستحضرات التجميل بشكل كبير في السنوات الأخيرة لتلبية الطلب على الجمال في عالم اليوم، مما أدى إلى إغراق السوق بالمركبات الكيميائية التي يجب التحقق من سلامتها. أصبحت اختبارات السمية ضرورية لتقييم هذه المنتجات، تتطلب الاختبارات التقليدية باهظة الثمن تطوير طرق بديلة أبسط وأسرع وأكثر اقتصاداً. أصبح اختبار HETCAM باستخدام غشاء بيض الدجاج المحضن طريقة مفضلة لتقييم سمية المواد الكيميائية ومستحضرات التجميل.

الهدف من هذا العمل هو اختبار القوة المهيجة لبعض مستحضرات التجميل باستخدام اختبار HETCAM. لإجراء هذا الاختبار، استخدمنا 29 بيضة جنينية حضنت عند 37 درجة مئوية لمدة 10 أيام، واختبرنا شاهداً سلبياً (0.9% مصل فسيولوجي) وشاهد إيجابي (هيدروكسيد الصوديوم) ومنتجاتنا، يتم تفسير النتائج من خلال عدم حدوث تهيج. وجدنا أن المنتجات المختبرة تتنوع بين التهيج المعتدل والتهيج الخفيف.

وخلص إلى أن اختبار HETCAM يجعل من الممكن تصنيف المواد وفقاً لقوتها المهيجة. يقدم هذا النهج مزايا مهمة مثل النتائج السريعة، والتكاليف المنخفضة والنهج الأخلاقي. إبراز أهمية استبدال التجارب على الحيوانات والتشخيص السريري لدى البشر.

الكلمات المفتاحية: اختبار الغشاء المشيمي، اختبار بديل، مقياس التهيج، اختبارات الحيوانات، التشخيص السريري، سلامة المنتجات، تقييم السمية.

Président du jury : Pr ZAAMA Djamilia (Prof – Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadrant : DrTEHAMI Soumia (MAHU- Université Salah Boubnider, Constantine 3).

Examinateur : DrMOURI Fouzia (MCB- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).