

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB de Blida



Faculté de sciences de la nature et de la vie

Département de biologie et physiologie cellulaire

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME DE MASTER**

Option : génie biologique

Thème

**Mise au point des méthodes alternatives (in vitro et in ovo) à
l'expérimentation animale pour évaluer le pouvoir irritant
oculaire des médicaments et cosmétiques**

Réalisé par :

M^{elle} Mokaddem Manel et M^{elle} Lazazi Hadjira

Soutenu **Juin 2016** devant le jury composé de :

Présidente : **Mme Guessaibia N.** M.C.B (USBD)

Examineur: **Mr Boukhatem M.N.** M.C.B (USDB)

Promoteur: **Mr CHADER H.** M.C.B (Alger)

Co-promotrice: **Mme Eddaikra A.** M.A.A (USDB)

Année universitaire 2015/2016

REMERCIEMENTS

Tout d'abord nous remercions **Dieu** qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Nos vifs et sincères remerciements vont à :

À Notre promoteur Monsieur **CHADER H.**, toxicologue et chef service de pharmacotoxicologie au LNCPP et maître de conférences à la faculté de pharmacie d'Alger, qui a dirigé ce travail et qui est pour nous un modèle de compétence et de professionnalisme à suivre.

Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation.

Votre confiance, vos conseils, vos réponses à nos nombreuses questions, vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse ont permis que notre travail se déroule dans de bonnes conditions et de manière enrichissante et méritent toute admiration.

À Notre Co-promotrice Madame **Eddaikra A.**, maître assistante à l'université de Blida.

Vous avez acceptés de faire partie de notre encadrement lors de ce mémoire de fin d'étude.

Vous nous avez fait confiance et vous nous avez permis d'avancer par vos conseils, vos encouragements et votre aide afin de pouvoir clôturer ce travail.

À Madame **GUESSAIBIA N.**, maître de conférences à l'université de Blida d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury.

À Monsieur **Boukhatem MN.**, maître de conférences à l'université de Blida pour avoir bien voulu examiner ce travail et être membre de jury.

À toute l'équipe de laboratoire nationale de contrôle des produits pharmaceutiques service pharmacotoxicologie surtout **M^{lle} Ouandjli Kenza.**

À nos enseignants et toute personne ayant contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Hadjira et Manel

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

À ma très chère mère « Fatiha » pour toute sa tendresse et pour ses nombreux sacrifices. Que dieu la garde.

À mon très cher père « Nordhine » pour l'encouragement et l'affection qu'il m'a protégé durant mes études. Que dieu me lui garde.

À mes frères et mes sœurs « Fayçal, Adem, Kadjer et Wafaa » qui sont toujours derrière moi.

À mon époux « Ali » pour son patience et ses nombreux encouragements.

À ma cousine « Djamila » pour ses aides.

À ma copine « Salem Lamia ».

À ma chère amie et sœur : mon binôme « Kadjira » pour ton soutien et ta patience.

À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

Manel

Dédicaces

Je dédie ce mémoire:

À Mes parents :

À Ma mère « Salima », qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

À Mon père « Hamid », qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

À Mes chers frères « Hourzddine » et « Azeddine » et surtout mon grand frère « Ahmed » qui sont toujours derrière moi.

À mes amis « Chahinez, Sihem, Sabrina, Hayat, Adiba, Saliha, les Soumis⁵ (Melek, Debbahi et Ouamara), Mohamed, Szif eddine et surtout Sidali ».

À mes cousines « Sarah, Meriem, Fifi, Sabrina, Hayat, Naima, Zouzou, Hanane et Amoula ».

À mes chères « Ainouz Meriem » et « Araibi Hadjira » qui ont partagé avec nous des moments de fatigue, tristesse et de folie inoubliables en LNCPP.

À Mes dames « Bouziane Hassiba » et « Dahmane Nawel ».

À toute l'équipe de LNCPP service pharmaco-toxico.

À toute ma famille et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail.

À Monsieur Makhfi Makhlouf qui nous a aidé pour la réalisation du test de HET-CAM et nous a donné les œufs fécondés.

Enfin à ma chère sœur « Manel » qui a souffert avec moi pour réaliser ce travail merci d'être toujours compréhensive et patiente je t'aime.

Hadjira

Liste des Tableaux :

Tableaux	Page
I. Les scores de test de DRAIZE	24-25-26
II. Les indices d'irritations oculaires maximales et classification des produits	40
III. Les moyennes des notations selon les temps d'apparition des effets inflammatoires (HET-CAM test)	44
IV. Classifications des différents produits selon la CI50 déterminé	50
V. Classification des différents produits selon les différents tests	51
VI. Paramètres du test de Draize (d'après wilhemusK.R.surv ophthalmol.2001).	Annexe II matériel et méthodes
VII. Le système de notation pour le test de DRAIZE	
VIII. Scores des phénomènes observés dans le HET-CAM test	
IX. L'échelle de classification des scores de HET –CAM test	
X. Les observations quotidiennes et les indices d'irritation oculaire après l'instillation du Mydriaticum pour six lapins.	Annexe III : Résultats
XI. Les observations quotidiennes et les indices d'irritation oculaire après l'instillation de l'optiflox pour six lapins.	54
XII. Les observations quotidiennes et les indices d'irritation oculaire après l'instillation de l'optidex pour six lapins	55
XIII. Les observations quotidiennes et les indices d'irritation oculaire après l'instillation du gel douche pour six lapins.	Annexe II matériel et méthodes
XIV. Les observations quotidiennes et les indices d'irritation oculaire après l'instillation du shampoing bébé pour six lapins	
XV. Résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application de Mydriaticum	
XVI. Résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application d'optiflox	
XVII. Résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application d'optidex	Annexe III : Résultats
XVIII. Résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application de gel douche.	

XIX. Résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application de shampoing bébé	
XX. La démarche à suivre après Estimation de la CI50 pour le test de relargage du rouge neutre	
XXI. Estimation de la CI50 de Mydriaticum	
XXII. Estimation de la CI50 de l'optiflox	
XXIII. Estimation de la CI50 de l'optidex	
XXIV. Estimation de la CI50 du gel douche	
XXV. Estimation de la CI50 de shampoing bébé	
XXVI. Détermination de la cytotoxicité des produits (test de Relargage de rouge neutre)	
XXVII. Détermination de la CI50 du gel douche	
XXVIII. Détermination de la CI50 du shampoing bébé	

Liste des figures

Figure	page
Figure 1: Principaux événements cliniques de l'irritation oculaire : (a) la cornée; (b) la conjonctive	5
Figure 2 : L'anatomie de l'œil	11
Figure 3 : schéma des cellules en suspension	17
Figure 4 : schéma des cellules adhérentes	17
Figure 5 : schéma des différents tests utilisés dans cette étude	23
Figure 6: Les étapes de la mise à nue de MCA	30
Figure 7: Coloration cellulaire avec la solution colorante rouge neutre.	31
Figure 8: Lecture des DO sur un lecteur de microplaques.	33
Figure 9 : Aspect de l'œil de lapin avant et après l'instillation des collyres.	35
Figure 10: Aspect de l'œil de lapin avant et après l'instillation du gel douche.	36-37
Figure 11: Aspect de l'œil de lapin avant et après l'instillation de shampooing bébé.	38
Figure 12 : histogramme qui représente les I.O.I des collyres, shampooing bébé et le gel douche en fonction du temps.	39
Figure 13: les phénomènes observés à l'œil nu après application des collyres sur la membrane chorioallantoïdienne.	40-41
Figure 14 : les phénomènes observés à l'œil nu après application de gel douche sur la membrane chorioallantoïdienne.	42
Figure 15 : les phénomènes observés à l'œil nu après application de shampooing bébé sur la membrane chorioallantoïdienne.	43
Figure 16 : observation des cellules A549 à l'aide d'un microscope à statif inversé GX40 après leurs incubation pendant 3 heures avec le colorant rouge neutre à 1/80 dans le milieu de culture RPMI.	45
Figure 17: graphes dose-réponse de la cytotoxicité du 1 ^{er} collyre (Mydriaticum) sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant rouge neutre. Estimation de la CI50	45
Figure 18 : graphes dose-réponse de la cytotoxicité du 2 ^{ème} collyre (Optiflox) sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant	46

rouge neutre. Estimation de la CI50	
Figure 19 : graphes dose-réponse de la cytotoxicité du 3 ^{ème} collyre (Optidex) sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisent le colorant rouge neutre. Estimation de la CI50	46
Figure 20 : graphes dose-réponse de la cytotoxicité du gel douche sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisent le colorant rouge neutre. C : Estimation de la CI50	47
Figure 21 : graphe dose-réponse de la cytotoxicité du gel douche sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisent le colorant rouge neutre. D : détermination de la CI50	48
Figure 22 : graphe dose-réponse de la cytotoxicité du shampoing bébé sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisent le colorant rouge neutre. A : Estimation de la CI50	49
Figure 23 : graphe dose-réponse de la cytotoxicité du shampoing bébé sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisent le colorant rouge neutre. B : détermination de la CI50	49

Liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection
CI 50	la concentration entraînant 50% de mortalité
DO	Densité Optique
DMSO	diméthyl sulfoxyde
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
HET-CAM	Hen's Eggs Test Chorioallantoic Membrane
I.O	Indice d'irritation Oculaire moyen
I.O.I	Indice d'irritation Oculaire Individuel.
I.O Max	Indice d'irritation Oculaire Maximal
L929	La lignée de cellules fibroblastiques de souris
LDH	Lactate deshydrogénase
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
SIRC	La lignée cellulaire de cornée de lapin
SVF	Sérum de veau fœtal
PBS	Phosphate Buffer Saline
INVITTOX	In Vitro Techniques in Toxicology
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Dodécyl Sulfate de Sodium
SLS	Sodium Lauryl Sulfate
UE	Union Européen

Glossaires

➤ Adénocarcinome

L'**adénocarcinome** est la forme de tumeur la plus courante aujourd'hui et représente près de 95 % des tumeurs cancéreuses. Le terme **adénocarcinome** vient du grec adeno (« la glande ») et de carcinome, qui désigne un cancer qui s'est développé à partir de cellules épithéliales ou glandulaires.

➤ Descémétocèle

Ulcère très profond atteignant la membrane de Descemet. Sous l'effet de la pression de l'humeur aqueuse dans la chambre antérieure, la membrane élastique très fine est poussée vers l'extérieur et apparaît quelquefois en relief par rapport à la surface de la cornée.

➤ Fluorescéine

La **fluorescéine** ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ou 3H-xanthène-3-one) est une substance chimique complexe composée de deux molécules de phénols liées à un cycle pyrane lui-même relié à un acide benzoïque. Cette substance dérivée du xanthène, acide, de couleur rougeâtre vue en transparence, est verte-fluo vue par réflexion de la lumière du jour, émet une lumière réfléchie de fluorescence lorsqu'elle est excitée sous les ultraviolets.

➤ Myosis

Le **myosis** est une diminution du diamètre de la pupille par contraction du muscle constricteur de l'iris, dont les fibres sont circulaires. C'est l'effet contraire de la mydriase.

➤ Paraphénylènediamine

La **paraphénylènediamine** (PPD) est une diamine aromatique utilisée dans la synthèse de polymères tel le Kevlar, les teintures pour cheveux, les colorants pour textile et les colorants incorporés aux caoutchoucs. Ses isomères sont la phénylhydrazine, l'*o*-phénylènediamine et la *m*-phénylènediamine.

Résumé

Les substances chimiques, y compris les produits ménagers, médicaments les produits chimiques industriels et les cosmétiques (tensioactifs), doivent être testés pour la toxicité ou l'irritation oculaire. Le test *in vivo* de Draize a été la méthode standard utilisée pour répondre à cette exigence. Cette procédure a souvent été critiquée en raison de la souffrance infligée aux animaux, dans nos travaux, des études comparatives ont été effectués entre les tests de tolérance oculaire réalisé *in vivo* sur les lapins ; *in ovo* avec le HET-CAM test sur embryons de poulet au 11ème jour et *in vitro* avec le test de Relargage de rouge neutre pour évaluer le pouvoir irritant de trois types de collyres et deux produits cosmétiques (shampooing et gel douche).

Les principaux résultats obtenus montrent que : les collyres sont considérés comme produits non irritants dans les trois tests, le gel douche est considéré comme irritant dans les tests *in vivo* et *in ovo* et de cytotoxicité importante dans le test *in vitro* et enfin le shampooing bébé est considéré comme non irritant dans le test *in vivo*, faiblement irritant dans le test *in ovo* et de cytotoxicité peu importante *in vitro*.

Donc les résultats montrent une certaine analogie entre les tests de références et les données bibliographiques.

A l'origine les lignées cellulaires utilisées pour ce test réalisé *in vitro* sont les SIRC et les L929 (T.J.A. Pinto et al.2009). Vu leur non disponibilité en Algérie, nous avons essayé d'adopter d'autre lignée telle que A549.

Les mots clés : Irritation oculaire, Test de DRAIZE, Méthodes alternatives, test de HET-CAM, Relargage de rouge neutre, Tensioactifs, A549.

Abstract:

Chemicals, including household products, drugs, industrial chemicals and cosmetics products, should be tested for toxicity or eye irritation. The test *in vivo* of Draize has been the standard method used to meet this requirement. This process has often been criticized because of the pain inflicted on animals. In our work, comparative studies were carried out between the ocular tolerance tests performed *in vivo* on rabbits; *in ovo* with the HET-CAM test on chick embryos on the 11th day and *in vitro* with the neutral red release assay.

The main results show that: eye drops are considered as non-irritants products in the three tests, the shower gel is considered as irritant in the tests *in vivo* and *in ovo* and significant cytotoxicity *in vitro* test and finally the baby shampoo is considered as non-irritant in the *in vivo* test, mildly irritating in the test *in ovo* and unimportant cytotoxicity *in vitro*.

So the results show a certain analogy between the reference tests and bibliographic data.

Originally the cell lines used for this test performed *in vitro* are the SIRC and L929 (T.J.A. Pinto and al. 2009). Given their unavailability in Algeria, we tried to adopt another line such as A549.

Key words: Ocular irritation, Draize test, alternatives methods, HET-CAM test, neutral red release, surfactants, A549.

ملخص

ينبغي اختبار المواد الكيميائية بما في ذلك من مواد منزلية, ادوية, مواد كيميائية صناعية و مستحضرات التجميل لما فيها من سموم قد تؤثر على العين و تسبب لها التهاب.

يعتبر اختبار درايزالاختبار الحي الامثل لتلبية هذه المطالب و لكن لطالما انتقد هذا الاختبار لما يلحقه من ألم على الحيوانات المخبرية. لذلك قمنا باختبارات بديلة كاختبار على بيضة الدجاج الملقحة في اليوم الحادي عشر و اختبار امتصاص محلول الأحمر المعتدل لمراقبة مدى الالتهاب الذي قد تسببه قطرات العين, هلام الاستحمام و شامبو الاطفال. النتائج الرئيسية المتحصل عليها تبين أن: قطرات العين تعتبر مواد غير مهيجة في الاختبارات الثلاثة, ويعتبر هلام الاستحمام مادة مهيجة في اختبار بيضة الدجاج الملقحة و في اختبار درايز, والسمية الخلوية كبيرة في اختبار امتصاص محلول احمر معتدل, وأخيرا شامبو الاطفال تعتبر غير مهيجة في اختبار درايز, تهيج ضعيف في اختبار البيضة الملقحة و ذو سمية خلوية غير مهمة في اختبار امتصاص محلول احمر المعتدل.

في الاصل الخلايا الواجب استعمالها في اختبار امتصاص محلول الاحمر المعتدل هي L929 او SIRC لكن نظرا لعدم وجودها في الجزائر اضطررنا لاستعمال نوع اخر هو خلايا A549.

الكلمات المفتاحية: التهاب العين, اختبار درايز, اختبارات بديلة, اختبار بيضة الدجاج الملقحة, اختبار امتصاص محلول احمر المعتدل, خلايا A549

Sommaire

Introduction	1
I. Rappels bibliographiques	
I.1. Toxicologie.....	2
I.2. Toxicité.....	2
I.2.1. Toxicité aigüe	2
I.2.2. Toxicité subaiguë.....	2
I.2.3. Toxicité sub-chronique	2
I.2.4. Toxicité chronique	2
I.3. La définition de la cytotoxicité.....	3
I.4. Irritation oculaire	3
I.4.1. Aspect Clinique	3
I.4.2. Mécanisme étiopathologiques	6
I.4.2.1. Effet des produits tensio-actifs ou détergents	6
I.4.2.2. Altérations du film lacrymal	6
I.4.2.3. Cytotoxicité cornéen	6
I.4.2.4. Les médiateurs de l'inflammation oculaire.....	6
I.5. Evaluation de l'irritation oculaire selon le test de Draize (test in vivo).....	7
I.5.1. Introduction	7
I.5.2. Test de Draize	8
I.5.3. Les bases anatomiques de l'utilisation de l'œil de lapin pour l'évaluation du pouvoir irritant	8
I.5.3.1. Conjonctive	8
I.5.3.2. Globe oculaire	9
I.5.3.3. Vascularisation.....	11
I.5.4. Les limites scientifiques du test de Draize	11
I.6. Les alternatives au test de DRAIZE	12
I.6.1. Règle des 3R: Réduire, Raffiner, Remplacer.....	12
<input type="checkbox"/> Réduire.....	13
<input type="checkbox"/> Raffiner	13
<input type="checkbox"/> Remplacer	14
I.6.2. Test <i>in ovo</i>	14
I.6.2.1. Test de HET-CAM (membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule).....	14

I.6.2.2. Propriétés de la membrane chorio-allantoïde.....	15
I.6.3. Test <i>in vitro</i>	16
I.6.3.1. Culture cellulaire.....	16
I.6.3.1.1. Matières premières :	16
I.6.3.1.2. Conditions requises pour la culture cellulaire	19
I.6.3.1.3. Avantages et inconvénients	20
I.6.3.2. Test de relargage du rouge neutre	20
II. Matériel et méthodes	
II.1. Matériel	23
II.1.1. Matériel biologique	23
II.1.2. Matériels non biologiques	23
II.2. Méthodes.....	24
II.2.1. Test <i>in vivo</i> (Test de DRAIZE)	24
II.2.1.1. Evaluation numérique des lésions oculaires	24
II.2.1.2. Détermination des indices d'irritation oculaire	26
II.2.2. Méthode <i>in ovo</i> (TEST de HET-CAM).....	27
II.2.2.1. Principe	27
II.2.2.2. Mode opératoire.....	27
II.2.3. Test <i>in vitro</i> (test de relargage de rouge neutre).....	30
II.2.3.1. Mode opératoire.....	30
III. Résultats et discussion	
III.1. Résultats	35
III.1.1. L'étude <i>in vivo</i> (Le test de DRAIZE)	35
III.1.1.1. Les collyres	35
III.1.1.2. Gel douche.....	36
III.1.1.3. Shampooining bébé	37
III.1.1.4. Classification de produits selon les indices d'irritations oculaires maximales	39
III.1.2. L'étude <i>in ovo</i> : Le test de HET-CAM	40

III.1.2.1. Les collyres	40
III.1.2.2. Gel douche.....	42
III.1.2.3. Shampoing bébé	43
III.1.3. Etude <i>in vitro</i> : Test de relargage de rouge neutre.....	45
III.1.3.1. Les collyres	45
III.1.3.2. Gel douche.....	47
III.1.3.3. Shampoing bébé	48
III.2. Discussion des résultats	52
Conclusion et perspectives.....	55

Introduction

Une grande variété de substances destinées à des fins pharmaceutiques, cosmétiques ou industrielles doivent être testées soit pour une toxicité ou une irritation des muqueuses comme les irritations oculaires de sorte à assurer la sécurité du consommateur.

L'emploi en pharmacologie de méthodes dites alternatives est très vaste et comprend en réalité toute méthodologie autre que l'expérimentation animale qui, de ce fait, pourrait supprimer ou, tout au moins, diminuer l'utilisation des animaux de laboratoire. Actuellement les méthodes *in vitro* représentent la quasi-totalité des méthodes alternatives. Le terme *in vitro* comprend l'utilisation d'organes, de culture de cellules et d'organites cellulaires. Les tests sur les animaux, tels que le test de Draize ont été exclusivement utilisées pour déterminer le niveau de toxicité oculaire par application d'une substance d'essai sur l'œil d'un lapin vivant et à l'évaluation de la réponse biologique **(Vinardell et Mitjans, 2008)**.

Le but de notre travail est de mise au point des méthodes alternatives au test de draize et Est-ce qu'elles peuvent vraiment remplacer l'expérimentation animale ?

Au cours de notre étude, nous avons évalué deux méthodes alternatives ; test de HET-CAM (*in ovo*) et relargage du rouge neutre (*in vitro*). Dans chacune de ces deux méthodes, des produits pharmaceutiques (collyres) et cosmétiques (tensio-actifs) ont été testés, ces méthodes alternatives ont été proposées sur la base de la classification biochimique et l'évaluation de ce qui pourrait être lié à un ou plusieurs événements cliniques survenus dans l'œil (processus d'irritation) notamment des réponses des tissus et des vaisseaux sanguins à des substances tensio-actifs, comme par exemple, la dénaturation des protéines de la membrane chorioallantoïdienne, la destruction et la cytotoxicité des cellules en culture .

I.1. Toxicologie

Discipline scientifique qui s'occupe des toxiques, de leurs propriétés, de leur devenir dans l'organisme, leur mode d'action, leur recherche dans différents milieux et les moyens (préventifs et curatifs) permettant de combattre leur nocivité (**VIALA et BOTTA, 2009**).

I.2. Toxicité

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

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

On distingue classiquement quatre formes essentielles de toxicité :

I.2.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë décrit les effets toxiques qui apparaissent généralement immédiatement ou dans un jour d'exposition à une substance toxique.

I.2.2. Toxicité subaiguë

Elle résulte d'expositions fréquentes ou répétées à une substance toxique sur une période de plusieurs jours ou semaines.

I.2.3. Toxicité sub-chronique

C'est la capacité d'un composé chimique toxique à provoquer des effets sur la santé pour plus d'un an d'exposition

I.2.4. Toxicité chronique

C'est la capacité d'un composé de causer des effets néfastes sur la santé après une longue période d'exposition répétée ou continue. (**CHRISTOS et al., 2016**)

I.3. La définition de la cytotoxicité

La cytotoxicité a été définie comme étant les effets néfastes de l'interférence avec les structures et / ou les processus essentiels pour la survie cellulaire, la prolifération et / ou la fonction (**EKWALL, 1983**).

I.4. Irritation oculaire

Irritation des yeux est définie comme l'apparition de dommages suite à l'application de la substance d'essai à la surface antérieure de l'œil, réversible après 21 jours (TG 405 de l'OCDE). Comme avec la corrosion de la peau, la corrosion des yeux est associée à la vision des dommages irréversibles affectant (**OECD. Test N° 405, 2012**).

I.4.1. Aspect Clinique

De nombreux composés chimiques peuvent entraîner des troubles et des irritations oculaires suite à une projection directe ou par émanation de vapeurs. Le degré de l'atteinte oculaire varie avec les propriétés physico-chimiques de l'agent et la durée de contact.

La symptomatologie est très variable d'un simple tableau clinique : sensation de brûlure, de corps étranger, de sécheresse, larmoiement, photophobie, vision fluctuante, rougeur oculaire. Vers une corrosion de la surface oculaire dont le pronostic est très défavorable (**GILLION *et al.*, 2012**).

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

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

Avec des produits fortement basiques, l'épithélium est totalement dissous, contrairement aux acides qui coagulent ce tissu. Il s'ensuit un œdème coréen, une hypervascularisation, une opacification suivie de nécrose du tissu coréen.

Si la cornée devient opaque, la lumière peut ne pas passer facilement et la vision peut être altérée partiellement ou totalement (**MERLE *et al.*, 2008**).

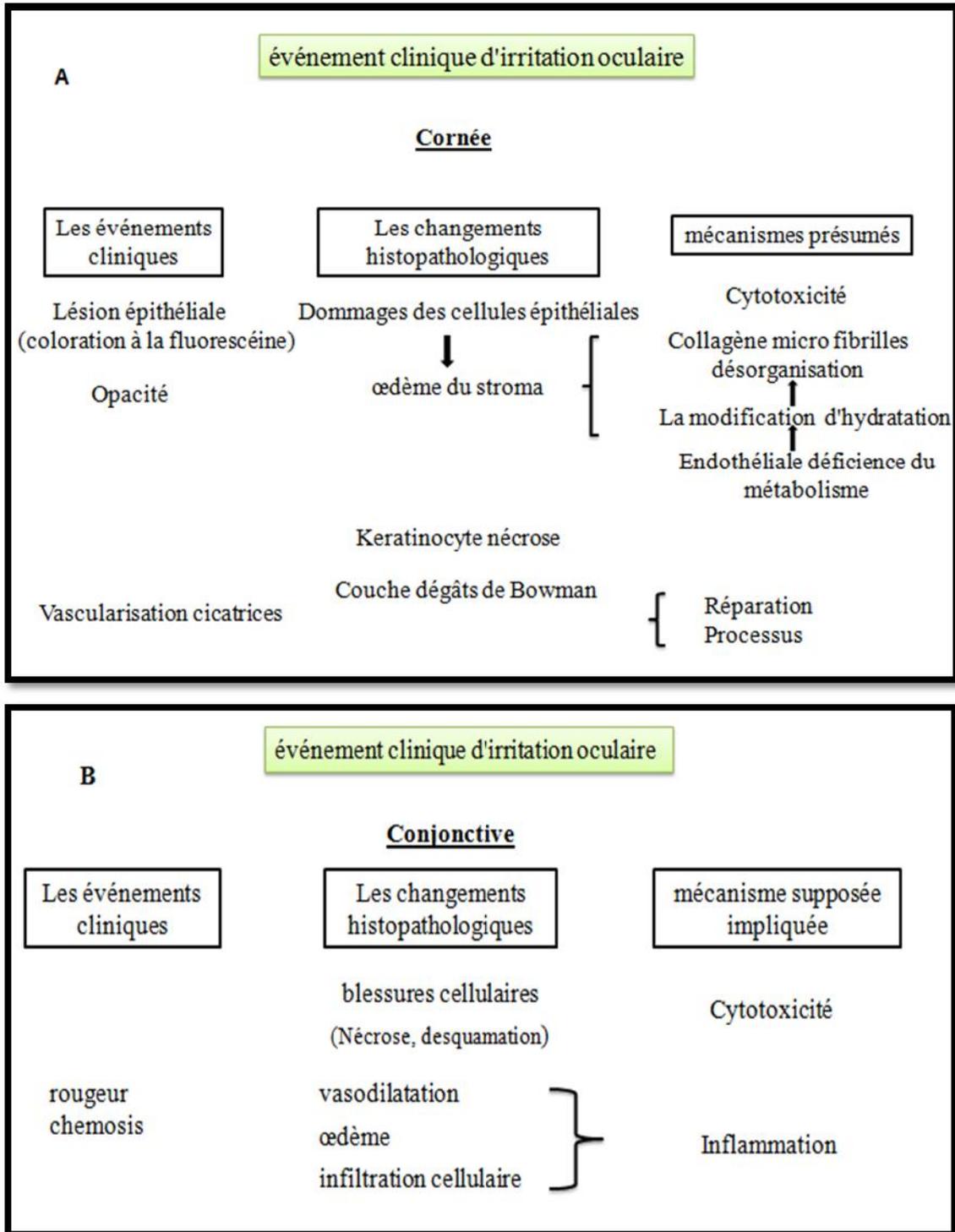


Figure 1: Principaux événements cliniques de l'irritation oculaire : (a) la cornée; (b) la conjonctive (ROUGIER *et al.*, 1994.)

I.4.2. Mécanisme étiopathologiques

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

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

Ces produits vont altérer la tension de surface des membranes cellulaires et s'insèrent au sein de la bicouche phospholipidique dont les composants présentent les mêmes propriétés biochimiques.

Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties de polarité différente, l'une lipophile (qui retient les matières grasses) et apolaire, l'autre hydrophile (miscible dans l'eau) et polaire.

Les détergents les plus agressifs peuvent affecter l'ensemble de la cornée jusqu'à l'endothélium et provoquer un descemetocèle dans de rares cas (**MAURER et PARKER, 2000**).

I.4.2.2. Altérations du film lacrymal

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

I.4.2.3. Cytotoxicité cornéen

Des modifications morphologiques de la cornée telles qu'une perte des microvillosités ou la rupture des jonctions intercellulaire augmentant la perméabilité et la pénétration des solutions ioniques, des substances lipophiles et des microorganismes. Les conséquences peuvent être sérieuses : épaissement de la cornée, atteinte de l'endothélium, opacité cornéenne.

I.4.2.4. Les médiateurs de l'inflammation oculaire

En cas d'inflammation on va observer des effets caractéristiques, à savoir, la douleur, l'œdème, la rougeur et la chaleur (**SLATTER, 1990**).

- **L'acide arachidonique**

Cet acide est obtenu par l'alimentation. Il est ensuite incorporé par les cellules au sein de leur bicouche phospholipidique. Il peut ensuite être relâché par l'enveloppe cellulaire en cas de stimulus mécanique ou chimique. L'acide arachidonique est à la base de la

cascade qui mène à la production de prostaglandine, leucotriène et de l'acide hydroxyeicosanoïque (WILKIE, 1990 ; DARTT *et al.*, 2011).

- **Les prostaglandines**

Les prostaglandines sont les premiers médiateurs impliqués en cas d'inflammation oculaire. Ils entraînent une hyperhémie oculaire (phénomène de « l'œil rouge »), un myosis et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Le myosis est provoqué par la contraction du muscle sphincter de l'iris (WILKIE, 1990 ; SLATTER, 1990 ; DARTT *et al.*, 2011).

- **Les médiateurs contenus dans les larmes**

En cas d'inflammation, les divers métabolites issus de la cascade de l'acide arachidonique vont entraîner une migration de polynucléaires des vaisseaux épiscléaux jusque dans les larmes (WILKIE, 1990).

- **Les régulateurs de l'inflammation et les interleukines**

Immédiatement après l'agression on observe une initiation de l'apoptose des kératinocytes au voisinage de la lésion. Cette destruction cellulaire permet notamment d'éviter une contamination du stroma par des virus pathogènes. L'interleukine-1 est le principal régulateur de la cascade inflammatoire cornéenne. Ce messenger est produit par les cellules de l'épithélium cornéen et est retrouvé dans les larmes. Le récepteur de l'interleukine-1 (IL-1) est quant à lui exprimé au sein des kératinocytes et fibroblastes du stroma. Si l'épithélium cornéen est rompu l'interleukine-1 va pouvoir se fixer à ses récepteurs et déclencher la cascade inflammatoire (DARTT *et al.*, 2011).

I.5. Evaluation de l'irritation oculaire selon le test de Draize (test in vivo)

I.5.1. Introduction

La nécessité pour les tests d'irritation oculaire est devenue évident dans les années 1930, quand un produit de cils non testé contenant paraphénylènediamine a été commercialisé aux États-Unis. L'utilisation de ces produits similaires a conduit à la sensibilisation des structures oculaires externes, ulcération de la cornée, et la perte de vision (WILHELMUS, 2001).

I.5.2. Test de Draize

Le test de Draize est un test d'irritation oculaire ou cutanée qui consiste à mettre une substance dans les yeux ou sur la peau d'un lapin immobilisé, puis l'observation et l'enregistrement des résultats.

Le test d'irritation de Draize sur l'œil courant évalue les changements observés dans les trois tissus : **la cornée, la conjonctive et l'iris**. Les lapins albinos sont les espèces d'essai habituelles (**BARILE, 2010**).

Ils sont utilisés pour ce test, en raison de la faible quantité de larmes produites par les yeux, permettant à la substance de rester dans l'œil plutôt que d'être lavés.

Le test de Draize sert à quatre objectifs principaux:

- a) l'identification des substances fortement irritantes et corrosives,
- b) tester le potentiel d'irritation oculaire modérée,
- c) évaluation de la sécurité des produits cosmétiques,
- d) l'évaluation de la sécurité médicaments ophtalmiques (**ESKES *et al.*, 2002**).

Le test est controversé parce qu'il est habituellement utilisé pour les cosmétiques et de produits ménagers, et en raison des différences entre les yeux de lapins et des yeux humains. Aussi controversée est la nature subjective du test dans l'enregistrement des résultats. Le test est nommé d'après John H. Draize, un toxicologue auprès de la Food and Drug Administration des États-Unis qui a développé le test.

Diverses techniques alternatives ont été proposées et développées par la suite en tant que remplaçants potentiels pour le criblage de la toxicité oculaire sur les animaux.

I.5.3. Les bases anatomiques de l'utilisation de l'œil de lapin pour l'évaluation du pouvoir irritant

I.5.3.1. Conjonctive

Il s'agit d'une fine muqueuse qui unit les paupières au globe oculaire. Elle fait environ 0,5 millimètres d'épaisseur. Elle adhère aux plans sous-jacents au niveau de la face bulbaire des paupières et près du limbe cornéen. La conjonctive est responsable de la sécrétion de mucus, essentiel pour la stabilité du film lacrymal et la transparence

cornéenne. Richement vascularisée, elle contient de nombreuses cellules immunocompétentes capables d'initier une réaction inflammatoire, d'y participer et de synthétiser des immunoglobulines. De plus, les caractéristiques morphologiques (les microvillosités) ou biochimiques (l'activité enzymatique) des cellules épithéliales les rendent capables d'englober et de phagocyter des particules étrangères (**CHOLKAR et al., 2013**).

Comparaison entre la conjonctive de lapin et celle de l'humain

- Le lapin est pourvu d'une membrane supplémentaire, la membrane nictitante encore appelée troisième paupière. Il s'agit d'une membrane de tissu conjonctif contenant selon les espèces plus ou moins de cartilages, qui assure par ses mouvements de nettoyage et surtout concourt à l'humidification du globe oculaire.
- Le réflexe de clignement des paupières est beaucoup plus lent chez le lapin que chez l'homme.
- Le cul-de sac conjonctival du lapin est plus large, ce qui permet à de plus grands volumes d'être instillé.
- Le volume de sécrétion lacrymale est plus faible chez le lapin que chez l'homme. Le canal de Schlemm, qui sert à l'évacuation des sécrétions lacrymales absent chez le lapin. (**KADDOUCI, 2005**)

I.5.3.2. Globe oculaire

Le globe oculaire a la forme d'une sphère. Il possède des membranes enveloppe et des milieux transparente ou réfringents. Sa face antérieure comporte la cornée transparente et en arrière d'elle se situent le cristallin et l'iris avec son ouverture centrale, la pupille. Le nerf optique émerge au niveau de la face postérieure du globe oculaire.

A- La cornée

La cornée est mince, transparent, lisse, a vasculaire, très innervé et le tissu le plus sensible dans le corps. Il est convexe asphérique de forme et directement exposée à l'environnement extérieur.

La cornée est en continuité avec la partie blanche de l'œil, appelé la sclérotique et le tissu semi-transparent, appelé la conjonctive. La bordure de la cornée, où elle continue

avec la sclérotique, est appelé le limbe. La surface cornéenne exposée à l'environnement extérieur est imprégné par le film lacrymal et sa surface intérieure est en contact direct avec fluide appelé humeur aqueuse. L'épaisseur de la cornée augmente progressivement du centre vers la périphérie (**DELMONTE et al 2011**). Ceci est observé avec une courbure de la cornée, ce qui est plus grande au centre et plus petite au niveau du limbe. (**CKOLKAR et al., 2013**).

➤ **Déférence entre la cornée de lapin et celle de l'humain :**

- La taille de la cornée du lapin est très supérieure à celle de l'homme, par rapport à la surface corporelle. Par contre, par rapport à la surface du globe oculaire, la taille de la cornée est beaucoup plus importante chez le lapin.
- Le tissu cornéen est plus épais chez l'homme (0.53mm) que chez le lapin (0.4 mm).

B- Iris

L'iris est situé dans la région postérieure de la cornée et se présente comme une racine du corps ciliaire. Sur le plan histologique, l'iris est composé de trois couches différentes endothélium, le stroma et épithélium.

L'iris est un tissu riche en fibroblastes et granocytes, richement vascularisé. (**CHOLKAR et al., 2013**)

➤ **Déférence avec l'œil de lapin**

- L'œil de lapin albinos est dépourvu de mélanine, sa couleur est due à la vascularisation.
- Le pH de l'humeur aqueuse est très légèrement plus élevé chez le lapin (7.6) que chez l'homme (7.2), ce qui rend le lapin plus sensible aux produits alcalins que l'œil humaine.

C- Cristallin

Le cristallin se présente comme une lentille biconvexe. Il se compose de fibres épithéliales allongées qui s'associent en en lamelles.

D- Rétine

La rétine est une fine membrane tapissant la surface interne du globe. C'est est un tissu neurosensoriel. Il est capable de capter les rayons lumineux et de transmettre les informations visuelles au système nerveux central.

I.5.3.3. Vascularisation

L'œil comprend deux systèmes vasculaires : les artères ciliaires et l'artère centrale de la rétine.

Tous les vaisseaux sont issus de l'artère ophtalmique. Les artères ciliaires postérieures représentent les branches afférentes de l'uvée. Le système vasculaire qu'elle contient assure non seulement la vascularisation mais intervient également de la pression intra-oculaire et dans la tension de globe oculaire. (CHOLKAR *et al.*, 2013).

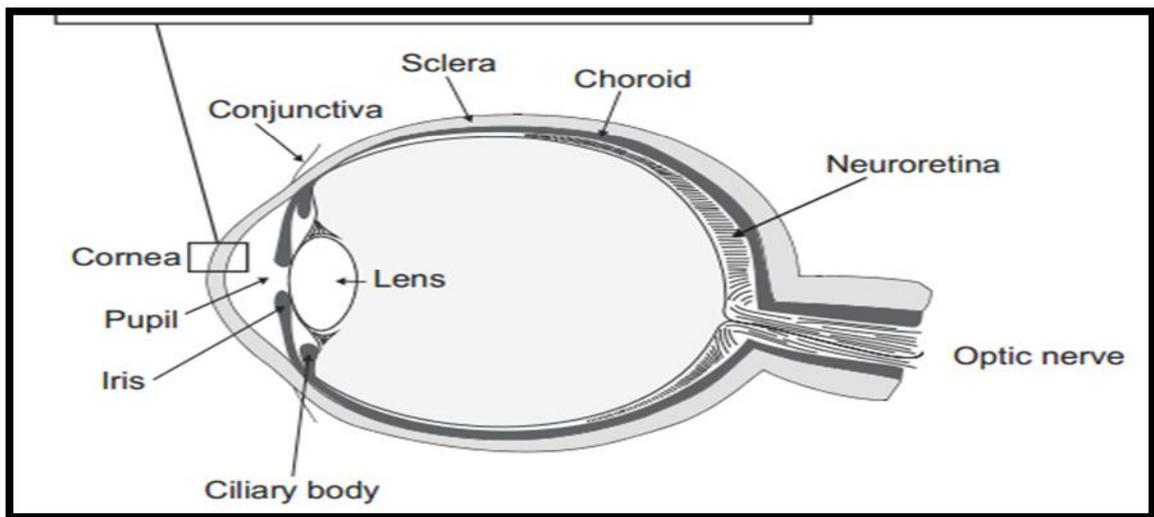


Figure 2 : L'anatomie de l'œil (CHOLKAR *et al.*, 2013).

I.5.4. Les limites scientifiques du test de Draize

- Contrairement à l'homme, le lapin a une membrane nictitante, ou troisième paupière ce qui modifie nécessairement les effets des substances.
- Le lapin produit beaucoup moins de larmes que les humains ce qui peut affecter les résultats des tests.
- L'acidité (pH) des yeux des êtres humains et les lapins sont différents. Chez l'homme, le pH est, en moyenne, de 7,1 - 7,3, tandis que chez les lapins, il est 8,2.
- L'épaisseur de la cornée et la structure des tissus des yeux d'un lapin sont différentes de celles d'un humain. L'épaisseur de la cornée chez l'homme est, en moyenne de 530 microns contre 400 microns chez le lapin.

I.6. Les alternatives au test de DRAIZE

Le terme « alternatif » a été inventé en 1978 par l'éminent physiologiste David Smyth dans son ouvrage *alternatif to Animal Experiments* [alternatives aux études expérimentales sur les animaux]. Ce mot est utilisé pour décrire toute modification aux procédures scientifiques établies qui a pour résultat le remplacement de l'utilisation des animaux, la réduction du nombre d'animaux utilisés ou le raffinement des techniques qui peuvent réduire la douleur chez les animaux. Par conséquent, le terme de Smyth, *alternative*, possède le même sens que les *Trois R* de Russell et Burch. (G.D.S, 2010).

Les méthodes alternatives basées sur des cultures cellulaires sont les plus utilisées. Leur intérêt principal est d'offrir la possibilité d'utiliser des cellules humaines (même si les cellules animales le sont également du fait de leur approvisionnement facile), ce qui permet a priori une extrapolation plus pertinente des résultats à l'Homme. (G.D.S, 2010).

Pour une utilisation dans un cadre réglementaire, ces méthodes doivent être reconnues ou validées. La validation consiste tout d'abord à prouver le concept, c'est-à-dire que la méthode répond aux résultats souhaités. C'est une étape scientifique réalisée par les pairs. La validation dite « réglementaire », par exemple par l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) (INERIS, 2011).

Depuis décembre 2009, la législation européenne a interdit l'utilisation des animaux non seulement pour la mise en évidence de la tolérance des produits finis mais aussi pour celle des ingrédients. Alors on doit faire appel aux méthodes alternatives *in vitro*, *in ovo* ou *ex vivo* (MARTINI, 2011).

I.6.1. Règle des 3R: Réduire, Raffiner, Remplacer

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

- **Reduce** (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation

- **Refine** (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points»)
- **Replace** (Remplacer) les modèles animaux

➤ **Réduire**

Cet objectif, initialement de bonnes pratiques en expérimentation animale, a, depuis Russell et Burch, été introduit dans la réglementation. Il figure à titre de recommandation dans le préambule de la convention STE123 (convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques) et de la directive 2010/63/UE ainsi que dans leur traduction en droit français

- Utiliser moins d'animaux en expérimentation peut être réalisé par différentes voies (éviter les répétitions inutiles)
- Rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation.

➤ **Raffiner**

Raffiner avant l'expérimentation consiste à :

- **Choisir avec soin le modèle animal utilisé** en prenant en compte l'état actuel des connaissances, ceci concerne aussi bien la pertinence du choix de l'espèce que le protocole lui-même, améliorer les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement des animaux dans le but d'augmenter autant que possible leur bien-être.
- **Planifier correctement le protocole** de façon à éviter des perturbations susceptibles de limiter la validité de l'expérience, et de conduire à ne pas réaliser la totalité de l'expérimentation dans les conditions optimales.
- **Entrainer les animaux à coopérer** (renforcement positif) pour certaines procédures de manière à diminuer le stress de l'animal et éviter le recours à l'anesthésie pour des actes non invasifs et non douloureux.

Raffiner pendant l'expérimentation elle-même concerne les méthodes choisies et les procédures opératoires utilisées. Il faut envisager, chaque fois que possible :

- D'éviter les tests douloureux (test de Draize, test d'irritation de la peau, emploi d'adjuvants)
- Réduire la durée de certaines études surtout toxicologiques,
- D'étudier des situations aiguës plutôt que chroniques,
- D'utiliser les procédures d'euthanasie appropriées.

Raffiner après l'expérimentation revient à exploiter au mieux les résultats obtenus lors de l'expérimentation (ex. études statistiques).

➤ Remplacer

Remplacer chaque fois que cela est possible le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro* ou "*in silico*" (modèles mathématiques, bio-informatique) (RUSSELL et BURCH, 1959).

I.6.2. Test *in ovo*

I.6.2.1. Test de HET-CAM (membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule)

Cette méthode a été développée par LUEPKE (LUEPKE, 1985) mais de nombreuses variantes ont été développées depuis donnant lieu à plusieurs enregistrements dans la base de données INVITTOX (SPIELMANN, 1992). Son objectif est d'observer les lésions provoquées par la substance à tester et de leur donner un score.

Dans le HET-CAM test les produits chimiques d'essai sont placés en contact direct avec la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule embryonné. L'apparition d'une lésion vasculaire ou une coagulation en réponse à un composé est la base pour l'emploi de cette technique comme une indication de la probabilité qu'un produit chimique pourrait endommager les muqueuses (en particulier pour les yeux) *in vivo*. Les solutions à tester sont ajoutées à la membrane et laissées en contact avec la membrane qui est examinée par une lésion vasculaire à des périodes fixes. L'irritabilité est marquée selon la gravité et la vitesse dans laquelle les dommages se produisent à fournir une indication de l'effet irritant probable du composé. La forme actuelle du test HET-CAM peut être

proposée comme méthode de présélection des tests d'irritation des yeux. (**LUEPKE et KEMPER, 1986**).

On utilise 4 œufs embryonnés incubés à 37°C pendant 10 jours. Le produit est alors déposé sur la membrane pendant 20s. Le rinçage est effectué avec du NaCl 0.9%. (**LUEPKE et KEMPER 1986**).

I.6.2.2. Propriétés de la membrane chorio-allantoïde ou abrégé CAM est une membrane vasculaire trouvée dans les œufs de certains amniotes, tels que les oiseaux et les reptiles. Elle est formée par la fusion des couches mésodermiques de deux structures de développement. Allantoïde et le chorion (**GILBERT, 2006**). Chez les mammifères, cette structure forme le placenta.

Trois couches différentes composent la membrane chorio; ceux-ci sont appelés l'épithélium chorionique, le mésenchyme et l'épithélium allantoïque. Des capillaires sanguins et des sinus se trouvent entre les cellules épithéliales de la couche chorionique, ce qui permet un contact étroit (à moins de 0,2 um) avec de l'air trouvé dans les pores de la membrane de la coquille de l'œuf (**FANCSI et FEHER, 1979**). En conséquence, la membrane chorio permet l'échange de gaz, tels que l'oxygène, à des embryons en développement. Au cours du développement embryonnaire des oiseaux, la membrane chorio joue également un rôle essentiel dans la formation des os par le transport du calcium dans l'embryon de la coquille (**GILBERT, 2006**).

Si son emploi a été envisagé comme méthode alternative, c'est parce qu'il s'agit d'une membrane vivante, possédant un système de vascularisation fonctionnel et approprié à l'étude de la réaction inflammatoire (**PERROT, 2006**).

Ce test n'est pas encore décrit officiellement par une ligne directrice de l'OCDE. Plusieurs variantes de cette technique ont été décrites. Toutes exigent que le produit à tester soit appliqué sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM) d'un œuf fécondé de poule, incubé pendant dix jours. A cette période de développement embryonnaire, les tissus nerveux et donc la sensation de douleur ne sont pas encore développés. Ceci permet ainsi d'être en accord avec la législation européenne qui interdit des tests sur des embryons plus âgés.

I.6.3. Test *in vitro*

I.6.3.1. Culture cellulaire

La culture cellulaire animale correspond au maintien en vie, en dehors d'un organisme de cellules non organisées en tissu (culture *in vitro*). Ces cellules sont préalablement dissociées les unes des autres et conservent la capacité de se diviser et à se différencier. Ceci est possible grâce au maintien à un environnement très proche de celui qu'elles rencontrent *in vivo* (BRANGER *et al.*, 2007)

La culture *in vitro* impose des exigences particulières afin de garder les caractéristiques originales des cellules et de réduire les risques de contamination des cultures, mais aussi des manipulateurs. Cette discipline dépend en grande partie du savoir-faire, de la formation et du comportement des personnels impliqués. Mettre en place une démarche qualité en suivant des méthodes et des procédures soigneusement établies sur la base des connaissances actuelles et en appliquant de bonnes pratiques est indispensable pour atteindre des objectifs scientifiques (BARLOVATZ-MEIMON *et RONOT*, 2014).

Les points essentiels des bonnes pratiques de culture cellulaire sont :

I.6.3.1.1. Matières premières : La qualité des matières premières utilisées (cellules, milieux, réactifs, consommables, etc.) peut s'affecter les performances des cultures et par conséquent les résultats scientifiques qui en découlent :

- **Cellules**

Différents types de cellules animales peuvent être cultivés en laboratoire et les modalités de culture dépendent de leur provenance (circulante, organique, saine, cancéreuse.. etc.) (BARLOVATZ-MEIMON *et RONOT*, 2014).

Type des cellules : Il existe deux types de culture de cellule :

- **Culture de cellule en suspension**

Technique de culture dans laquelle les cellules se multiplient sans avoir besoin d'un support fixe, les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension.

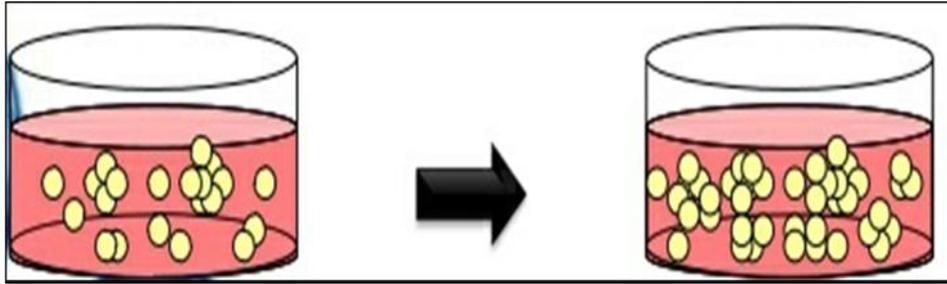


Figure 3 : schéma des cellules en suspension

- **Culture de cellules adhérentes (culture sur support)**

La culture stationnaire est liée à la propriété que la majorité des cellules d'un organisme animal ont d'être fixes dans un tissu organisé. Cette propriété d'adhérence des cellules in vivo se retrouve in vitro où les cellules introduites dans un récipient de culture vont adhérer à sa surface et s'y développer (**ADOLPHE, 1995**).

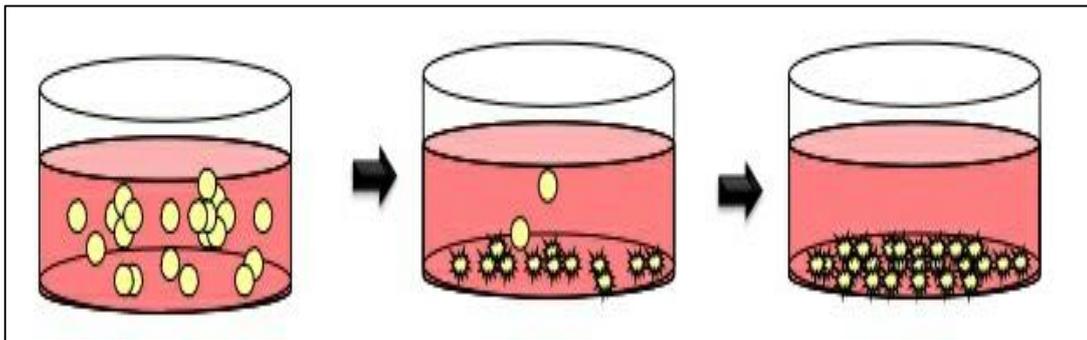


Figure 4 : schéma des cellules adhérentes

A. Origine des cellules :

- **Les cultures primaires** : obtenues directement ou après digestion enzymatique d'un explant de tissu qui peuvent être maintenues en culture pendant un temps limité
- **Les cultures continues** : issues de tumeurs, immortalisées par infection virale ou par traitement chimique mutagène. Ces lignés cellulaires peuvent être cultivées durant quelques dizaines de divisions (avant d'entrer en sénescence) ou indéfiniment.

B. Contrôle de qualité des cellules : (reproductibilité).

C. Contrôle de la stérilité : les cultures doivent être exemptes de tous types de contamination microbiologiques qui peuvent perturber la viabilité et la

croissance, et/ou altérer les caractéristiques et les fonctions cellulaires influençant, in fine la qualité des résultats des études menées.

○ **Milieus de culture et additifs**

Les milieux de culture sont composés des éléments nutritifs essentiels au maintien des cellules en culture in vitro comme :

- Les sels minéraux servant de cofacteurs d'enzymes jouent un rôle dans la pression osmotique et le potentiel de membrane, les communications (Ca^{2+}), les transports (Na^+), la régulation du pH, l'attachement des cellules (Ca^{2+}) et entrent dans la constitution de certaines molécules (groupement prosthétique, phosphate ou autres).

- Les carbohydrates utilisés comme sources d'énergie et sources de carbones sont des dérivés de sucres (glucose et galactose).

- Les acides aminés essentiels et non essentiels : sont nécessaires aux cellules pour la synthèse des protéines.

- Les vitamines sont des cofacteurs d'enzymes ou des précurseurs pour la synthèse des molécules.

- système tampon nécessaires à la régulation du pH.

- Le rouge de phénol est un indicateur coloré dont la zone de virage est située entre pH 7,2 et 7,6. Il permet de visualiser les variations de pH du milieu de culture, due à l'activité cellulaire ou à une éventuelle contamination.

Différents constituants peuvent être additionnés en fonction des exigences du type cellulaire cultivé, à des concentrations définies, tels que : les hormones, les facteurs de croissance, les facteurs d'attachement, les protéines de transport, les antioxydants ...etc.

- Sérum et substituts : mises en culture en présence d'un milieu de base, la plupart des cellules ne sont généralement aptes qu'à survivre. Le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, le plus souvent fournis par le sérum.

Le sérum est un mélange complexe de protéines, d'ions et d'eau. Il existe différentes sources de sérums utilisables en culture (bovine, humaine ...). Le plus courant est le sérum de veau fœtal SVF.

- Antibiotiques : l'usage des agents antimicrobiens est répandu dans le domaine de la culture cellulaire. La plupart des antibiotiques suppriment la croissance des microorganismes en bloquant les voies anaboliques (**BARLOVATZ-MEIMON et RNOT, 2014**).

I.6.3.1.2. Conditions requises pour la culture cellulaire

Les cultures cellulaires nécessitent un environnement strictement contrôlé pour assurer leur survie. Des incubateurs spéciaux fournissent les conditions précises de Température, CO₂, et d'hygrométrie.

- ✓ **Température** : Une température constante dans l'incubateur est essentielle au maintien des cellules en culture. La température idéale de culture des cellules de mammifères est de 37°C.
- ✓ **CO₂** : 5 à 10% de CO₂
- ✓ **Humidité** : Il est impératif de maintenir un taux d'humidité entre 95 % et 98% à l'intérieur de l'incubateur, afin d'éviter le dessèchement des cultures.
- ✓ **L'oxygène** : Les besoins en oxygène varient suivant le type cellulaire. Mais la plupart des cellules se cultivent en normoxie (21% d'oxygène ambiant). La culture *in vitro* est généralement réalisée à des tensions d'oxygène qui sont proches de l'atmosphère (20%). Examen des tensions d'oxygène *in vivo* suggère que 10-13% d'oxygène est le maximum qui doit être utilisé, et pour certains tissus (par exemple placenta), des niveaux inférieurs sont physiologique.
- ✓ **Le pH** : Le pH des milieux de culture doit se situer, comme le pH sanguin, entre 7.2 et 7.4, On utilise donc le tampon physiologique qui est bicarbonate. L'équilibre est maintenu grâce à une atmosphère contenant 5 à 10% de CO₂ (**BRANGER et al., 2007**)
- ✓ **Stérilité** : Il faut aussi nettoyer la surface de travail et la hotte avec l'éthanol à 70% avant et après chaque manipe, porter des blouses jetables, gants ... etc.

I.6.3.1.3. Avantages et inconvénients

Les cellules en culture présentent plusieurs avantages sur les organismes intacts pour la recherche en biologie cellulaire tels que :

- la plupart des tissus animaux et végétaux sont constitués de différents types de cellules, alors que des cellules d'un type spécifique avec des propriétés homogènes peuvent être cultivées.
- les conditions expérimentales (comme la composition de l'environnement extracellulaire) peuvent être nettement mieux contrôlées en culture que dans un organisme intact.
- Troisièmement, dans de nombreux cas, une cellule unique peut rapidement se développer en une colonie constituée de nombreuses cellules identiques, un processus appelé clonage cellulaire.
- Multiplier les essais.
- Limiter le nombre d'animaux d'expérience : avantage éthique.
- Les essais sur des cellules humaines permettent d'éviter la différence d'espèce.

Un des principaux inconvénients des cellules en culture est le fait qu'elles ne sont pas dans leur environnement normal et que, par conséquent, leurs activités ne sont pas régulées par les autres cellules et tissus comme le cas dans un organisme intact. En plus l'environnement immédiat des cellules en culture diffère radicalement de leur environnement normal, par conséquent, leurs propriétés normales des cellules dans les tissus et les organismes complexes d'après des expériences menées uniquement sur des cellules isolées en culture (**LODISH et al., 2005**).

I.6.3.2. Test de relargage du rouge neutre

Le rouge neutre (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine hydrochloride) est un colorant vital faiblement cationique qui diffuse facilement au travers des membranes cellulaires, puis qui s'accumule dans les lysosomes où il se lie aux sites anioniques de la matrice lysosomale. Le test de cytotoxicité de relargage de rouge neutre a été développé à l'Université Rockefeller par Borenfreund et *al.* (1985, 1988) Comme test de viabilité cellulaire. Il est basé sur la capacité de la séquestration du rouge neutre dans les lysosomes ne se maintient pas dans les cellules non viables. L'évaluation du taux d'incorporation du rouge neutre se fait après fixation des cellules, puis extraction du

rouge neutre avec un mélange acide acétique-éthanol et quantification par spectrophotométrie à 540nm.

Cette méthode est une alternative à l'expérimentation animale entrant dans une batterie de tests qui concourent à l'évaluation du potentiel irritant oculaire des produits cosmétiques (**Barlovatz-Meimon et Ronot, 2014**).

Le principe est basé sur l'évaluation de la Cytotoxicité du produit testé par détermination de la concentration entraînant 50% de mortalité (CI 50), deux étapes sont nécessaires à la classification du produit. La première permet d'estimer la valeur de la CI 50 et la seconde de la préciser (**J.O.F, 1999**).

Les limites : Cette méthode peut provoquer une surestimation du potentiel irritant des formulations contenant plus de 10 % de tensioactifs en matière active (**J.O.F 1999**).

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCPP) d'Alger, pendant une période de 5 mois et cela à partir du 24/01/2016 jusqu'au 01/06 de la même année.

Elle a été réalisée dans le cadre du contrôle de la toxicité de produits cosmétiques (gel douche de fabrication locale, shampoing pour bébé importé disponible sur le marché Algérien) et pharmacologique de trois types de collyres qui sont : Mydriaticum, optiflox, optidex.

Compositions des collyres

- 1- **Mydriaticum** : Tropicamide 0.5g, Chlorure de benzankonuim, Chlorure de sodium, Eau purifié.
- 2- **Optidex** : Tobramycine 3.0mg, Dexaméthasone 1.0mg, Chlorure de benzankonuim 0.06mg
- 3- **Optiflox** : Ofloxacin 3.0mg, Chlorure de benzankonuim 0.05mg.

Compositions du Gel douche : Aqua, sodium laureth sulfate, coco glucoside, cocamidopropyl betaine, glycerine, lauryl alcohol (and) dicaprylyl ether, polyquaternium-7, sodium chloride, EDTA, acide citrique, conservator, perfume.

Compositions du Shampoing bébé : Aqua, coco-glucoside, cocamidopropyl betaine, glycerine, lauryl glucoside, , sodium chloride, glyceryl oleate, ammonium lauryl sulfate, penthenol, chamomilla recutita extract, propylene glycol, sodium hydroxyde, 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol, methylchloroisothiazolinone, methylisothiazolinone, CI16255, CI 47005, perfume.

Notre étude a été répartit en trois étapes selon l'organigramme suivant :

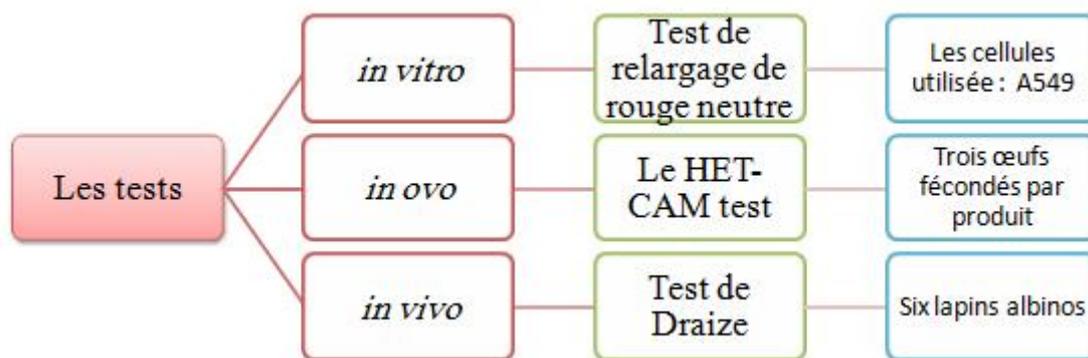


Figure 5 : schéma des différents tests utilisés dans cette étude

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Nous avons utilisé trois cibles pour le contrôle de la toxicité des produits cosmétiques et pharmacologiques à savoir :

- **Des lapins albinos Néo-Zélandais** : Ce dernier élevées dans l'animalerie de LNCPP
- **Des œufs de poule embryonnés**, d'un poids compris entre 50 et 65 g le jour de la réception.
- **Une lignée cellulaire A549** : la lignée cellulaire A549 a été choisie à cause de sa facilité à être cultivée. Cette lignée est issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire prélevé chez un patient de type caucasien, âgé de 58 ans. Les cellules ont été conservées tel que recommandé par le fournisseur, c'est-à-dire dans une solution contenant du sérum de veau fœtal (SVF) à une concentration finale de 10% et du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5%, complété par un milieu de culture RPMI. Le DMSO est un solvant polaire organique utilisé comme agent Cryo protecteur. Il permet d'éviter une trop grande mortalité lors de la congélation

II.1.2. Matériels non biologiques

Voir (Annexe II)

II.2. Méthodes

II.2.1. Test *in vivo* (Test de DRAIZE)

Cet essai doit être effectué sur six lapins.

Chaque lapin de l'étude est testé comme suit :

- S'assurer que le lapin a les deux yeux sains et sans défaut.
- Placer le lapin dans la boîte de contention et l'immobiliser.
- Instiller 1ml de produit testé dans le sac conjonctival de l'œil gauche du lapin.
- Maintenir les deux paupières fermées pendant 10 secondes afin d'éviter toute perte de produit.
- Observer l'œil à 1 heure puis un, deux, trois, quatre et sept jours après l'opération utilisant l'œil droit non instillé comme témoin pour évaluer la présence d'une irritation dans l'œil traité.

Nous avons examiné les différentes parties de l'œil et observer les lésions :

- Conjonctive (Chémosis, larmoiement, rougissement).
- Iris.
- Cornée (degré et surface d'application).

L'observation de la cornée sera complétée par un autre examen après instillation de la solution de fluorescéine et rinçage à l'aide de solution de Chlorure de Sodium, elle pourra être poursuivie en utilisant la lampe U.V.

II.2.1.1. Evaluation numérique des lésions oculaires

Selon la gravité de la lésion observée, une note est attribuée, afin de calculer l'indice d'irritation oculaire (IOI).

Tableau I : les scores de test de DRAIZE (Draize et *al.*, 1944), (Chambers et *al.*, 1993)

Conjonctive	
Chemosis (A)	Echelle numérique

Pas de gonflement	0
Gonflement y' à compris la membrane nictitante	1
Gonflement avec éversion de la paupière	2
Gonflement avec paupière à demi fermées	3
Gonflement avec paupière plus qu' à moitié ou complètement	4
Larmolement (B)	Echelle numérique
Absence de larmolement	0
Larmolement léger	1
Larmolement, avec humidification de la paupière et des poils avoisinant la paupière	2
Larmolement, avec humidification de la paupière et des poils sur de larges surfaces autour de l'œil	3
Rougisement (C)	Echelle numérique
Vaisseaux normaux	0
Vaisseaux nettement injectés que la normale	1
Vaisseaux difficiles à distinguer individuellement :	
Couleur rouge vif, diffuse	2
Couleur rouge foncée, diffuse	3
Score = (A+B+C)*2	
Iris (A)	
Iris normal	0

Iris nettement plus plissé que la normale congestion, gonflement, iris réagissant encore à la lumière lentement	1
Pas de réaction à la lumière destruction implantant	2
Score = A*5	
La cornée	
Degré d'opacification (A)	Echelle numérique
Aucune modification visible	0
Présence de zones translucides diffuses, détails de l'iris clairement visible	1
Présence de zones translucides diffuses, détails de l'iris légèrement masqués	2
Présence d'une opacité cornéenne rendant l'iris et la pupille invisibles	3
Surface d'opacité (B)	Echelle numérique
¼	1
Entre ¼ et ½	2
Entre ½ et ¾	3
Entre ¾ et toute la surface	4
Score = (A*B)*5	

II.2.1.2. Détermination des indices d'irritation oculaire

Pour calculer l'indice, nous avons fait les équations suivantes :

- Additionner les notes obtenues pour chacun des six lapins à chaque temps d'observation ce qui nous donne l'indice d'Irritation Oculaire Individuel : I.O.I.

- Faire à chaque temps la moyenne des I.O.I des 6 lapins ce qui nous donne l'Indice d'Irritation Oculaire moyen.

Noter parmi les 6 I.O celui qui a la valeur la plus élevée. (L'Indice d'Irritation Oculaire Maximum). Le temps d'apparition de celui-ci sera précisé (**JORF, 1984**).

Les résultats seront interprétés selon le tableau XIII (annexe II).

II.2.2. Méthode *in ovo* (TEST de HET-CAM)

II.2.2.1. Principe : Le principe en est basé sur l'observation des effets irritants (hyperémie, hémorragie, coagulation) pouvant survenir dans les cinq minutes suivant le dépôt d'un produit sur la membrane chorioallantoïdienne (MCA) d'œuf de poule embryonné, au dixième jour d'incubation. L'effet irritant du produit à l'essai est évalué sur trois œufs. En fin d'essai, les œufs reçoivent une injection de pentobarbital puis sont éliminés.

II.2.2.2. Mode opératoire

Dès la réception, les œufs fêlés ou cassés sont éliminés. Les autres sont conservés à l'abri de la lumière à une température de $(12 \pm 1) ^\circ\text{C}$ pendant au moins vingt-quatre heures avant de les placer en couveuse.

Les œufs sont pesés et identifiés puis placés dans l'incubateur à une température optimale de $37,8^\circ\text{C}$ et une humidité comprise entre (50 - 60) %. Si l'incubateur n'est pas équipé d'un système de retournement automatique, les œufs doivent être retournés manuellement au moins deux fois par jour.

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

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

Les différentes étapes de l'essai sont enchaînées rapidement sous un éclairage d'une intensité suffisante ne dégageant pas de chaleur afin de ne pas dessécher la MCA. Dans le cas contraire, l'atmosphère est humidifiée à l'aide d'un brumisateur. L'œuf étant placé verticalement sur un support (poche d'air vers le haut), la coquille est entaillée au niveau de la poche d'air en prenant soin de ne pas léser la CAM. Par la

suite, à l'aide d'une pince ou d'une paire de ciseaux à bouts ronds, la coquille est enlevée jusqu'au niveau de la membrane coquillière.

Toute la surface de la membrane coquillière est alors humidifiée avec du soluté isotonique de chlorure de sodium tiédi à 37°C. Le soluté est ensuite éliminé par inclinaison de l'œuf.

En utilisant une pince, la membrane coquillière est décollée délicatement puis retirée afin de découvrir la membrane chorioallantoïdienne sous-jacente. (Tout œuf dont la membrane chorioallantoïdienne est défectueuse ou présente des traces d'hémorragie est rejeté).

0,30 ml du produit à l'essai (pur ou dilué), maintenu à 37° C, sont alors déposés délicatement sur la MCA à l'aide d'une seringue ou d'une pipette. Après 20 secondes de contact, la membrane est rincée avec 5 ml de soluté isotonique de chlorure de sodium (37 ° C) à l'aide d'une seringue en évitant toute projection brutale. Le liquide de rinçage est éliminé par inclinaison de l'œuf.

Les éventuels phénomènes d'irritation sont observés pendant 5 minutes selon la procédure décrite ci-après. Le temps exact d'apparition de chaque phénomène est relevé.

La lecture

- Les observations prises en compte pour la notation du produit doivent être réalisées à l'œil nu.
- Les phénomènes observés (hyperémie, hémorragie, coagulation) ne sont pas retenus en fonction de leur intensité mais en fonction de leur présence : il s'agit d'une réponse de type tout ou rien.

Ainsi le temps est noté à l'apparition de chacun des phénomènes :

- **Hyperémie** : ce phénomène est observé lorsque des capillaires non visibles avant l'ajout du produit deviennent visibles, alors que les capillaires visibles se dilatent et deviennent plus rouges. Ce phénomène peut également affecter les vaisseaux de diamètre supérieur.
- **Hémorragie** : ce phénomène est observé lorsque la 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).

Remarque : l'hémorragie peut présenter un caractère éphémère ; elle doit néanmoins être prise en compte

- l'observation, dans les 30 premières secondes, d'une hémorragie massive impose la prise en compte de l'hyperémie masquée.
- **Coagulation (opacité et/ou thrombose)**

Opacité: caractérisé par l'apparition d'un voile opalescent évoluant éventuellement vers une opacification, soit d'une opacification directe sur tout ou une partie de la membrane.

Remarque : dans ce cas, il est nécessaire de vérifier que le phénomène n'est pas lié au comportement physicochimique du produit en milieu aqueux (par exemple formation d'un colloïde, d'un précipité, ...).

Thrombose: caractérisé par une rupture du flux sanguin dans les vaisseaux se traduisant un aspect segmenté (alternance d'étranglements et de zones turgescentes plus ou moins sombres). Il est à noter que les observations ne doivent pas prendre en compte les modifications intervenues au niveau des capillaires (**Luepke, 1985 ; LUEPKE et KEMPER 1986**) .

Les résultats sont interprétés selon les 2 tableaux XIV et XV (voir annexes II)

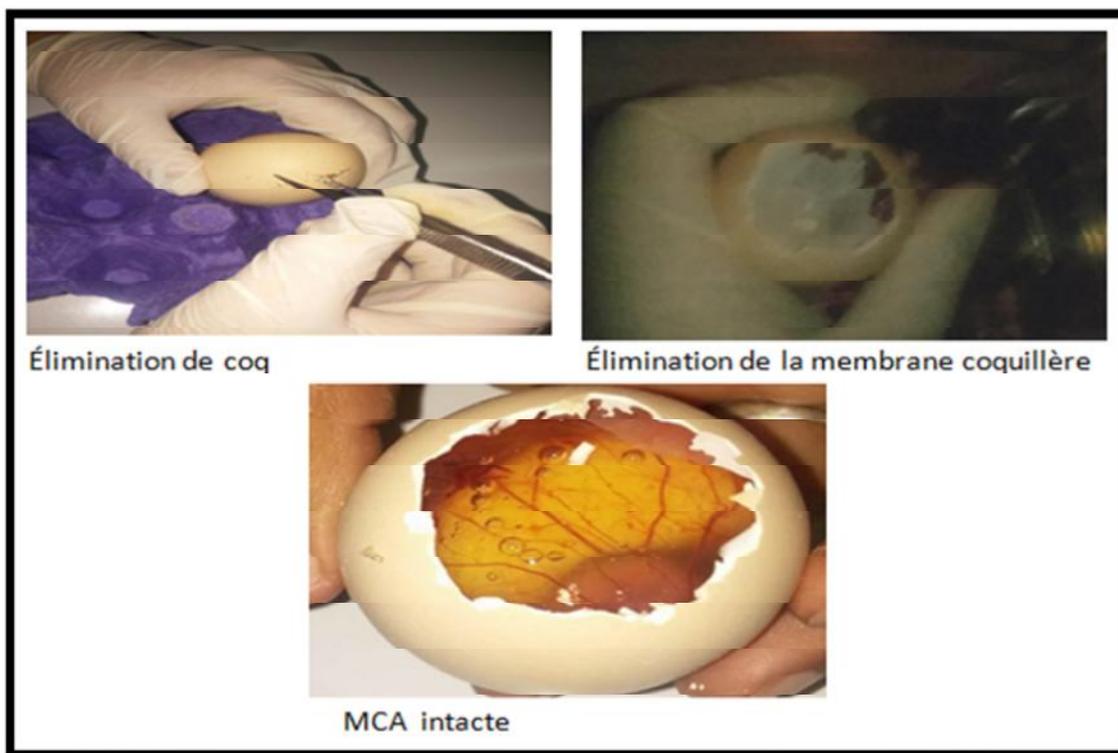


Figure 6 : Les étapes de la mise à nue de MCA

II.2.3. Test *in vitro* (test de relargage de rouge neutre)

II.2.3.1. Mode opératoire

1- Ensemencement des cellules (La veille de l'essai) : Les cellules sont trypsinées et comptées conformément. Les cellules sont ensuite ensemencées en microplaque de 24 puits, à raison de 200 000 cellules par puits sous un volume de 1 ml de milieu RPMI complet sans agitation. La plaque est placée au moins 24h à l'incubateur à 5% de CO₂ et à 37°C.

2- Coloration cellulaire (Le jour de l'essai) 24 heures après l'ensemencement, le milieu de culture de chaque puits est éliminé. La solution colorante de rouge neutre, après centrifugation à 3 000 tours/10 minutes, est déposée à raison de 1 ml par puits. La plaque est placée trois heures à l'incubateur à 5% de CO₂ et à 37°C.

Après ce temps de contact, la solution colorante est éliminée et remplacée par 1 ml de milieu de culture complet, par puits. Par la suite, La microplaque est maintenue à température ambiante pendant 30 min avant de mettre en contact avec le produit à l'essai.



Figure 7 : Coloration cellulaire avec la solution colorante rouge neutre

- **Estimation de la concentration inhibitrice (CI 50) :** La concentration inhibitrice est déterminée par rapport à un témoin négatif où il y a 0 du produit. Le témoin positif est un produit de toxicité connue

Le produit est dilué à : 5, 15, 25, 35 et 50 %. Les dilutions 5, 15, 25 et 35 % sont testées une fois et la dilution 50 % deux fois.

Détermination de la concentration inhibitrice (CI50) : Le choix des dilutions à tester deux fois dans cette étape dépend de l'estimation faite à l'étape précédente. Si les dilutions imposées de la deuxième étape ne permettent pas la détermination de la CI 50, une dilution supplémentaire sera utilisée deux fois sur la même microplaque. Cette dilution sera égale à plus ou moins à 5 % des bornes minimales ou maximales imposées.

-**Contact avec le produit à l'essai :** Chaque puits est préalablement rincé avec 1 ml de NaCl maintenu à température ambiante, avant d'être traité avec 500 µl par dilution du produit à l'essai.

Le temps de contact est de 30 secondes pour les tensioactifs et les formulations contenant plus de 10 % de tensioactifs en matière active (ex. : gels douche, shampoings, etc.)

Après de 25 secondes de contact, la dilution testée est aspirée. A 30 secondes précises, 5 rinçages successifs sont effectués.

Le surnageant est aspiré après chaque rinçage. Après le dernier rinçage, les puits restent dépourvus de milieu en attendant la phase de révélation.

-Révélation de la cytotoxicité : Après traitement complet de la microplaque, 1 ml par puits de la solution de révélation (acide acétique (1 %)/ l'éthanol à (50%)) est déposé. La microplaque est agitée modérément pendant 15 minutes.

-Lecture et expression des résultats

Les solutions révélées sont réparties dans une microplaque de 96 puits à raison de 200 µl/puits. La lecture de la densité optique est réalisée à 540 nm contre le blanc (solution de révélation), sur un lecteur de microplaques.

On obtient une valeur de densité optique (DO) par puits. Le pourcentage de mortalité cellulaire est calculé pour chaque dilution de produit à l'essai selon la formule :

$$\% \text{ de mortalité} = 100 - \frac{\text{D.O moyenne des puits traite}}{\text{D.O moyenne des puits témoins}} * 100$$

La courbe du pourcentage de mortalité cellulaire en fonction de la concentration en produit à l'essai est tracée. La CI_{50} du produit à l'essai est alors calculée par analyse de régression linéaire.

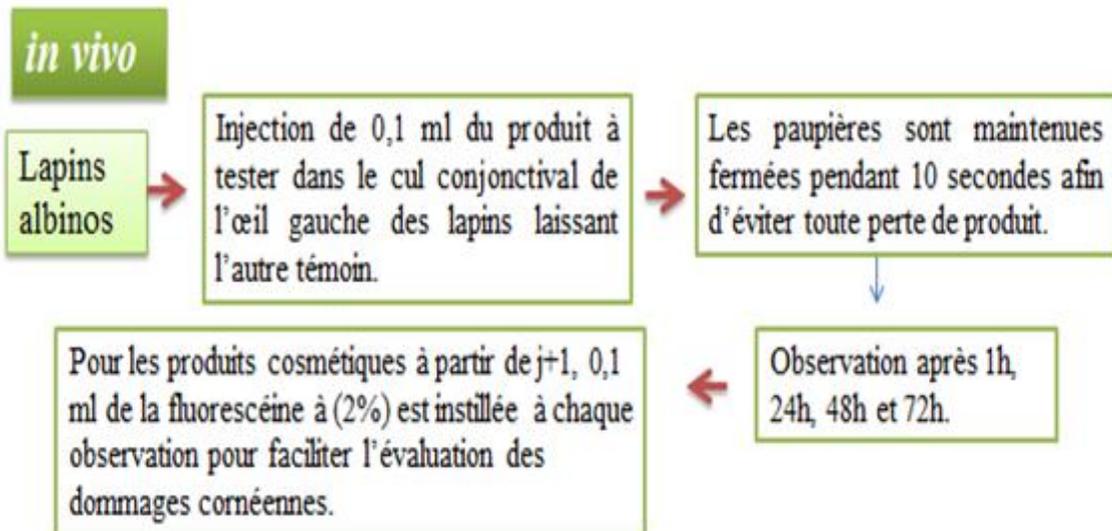
Remarques : pour vérifier la validité de l'essai, il est conseillé de procéder systématiquement à des contrôles à l'aide des témoins suivants :

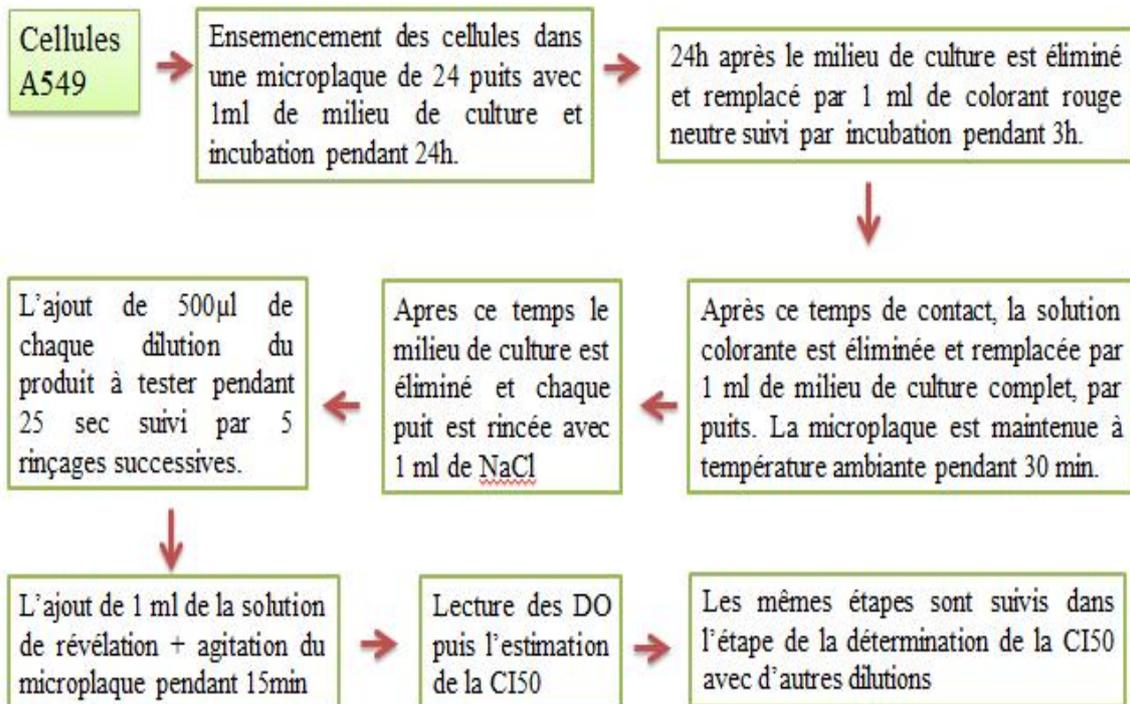
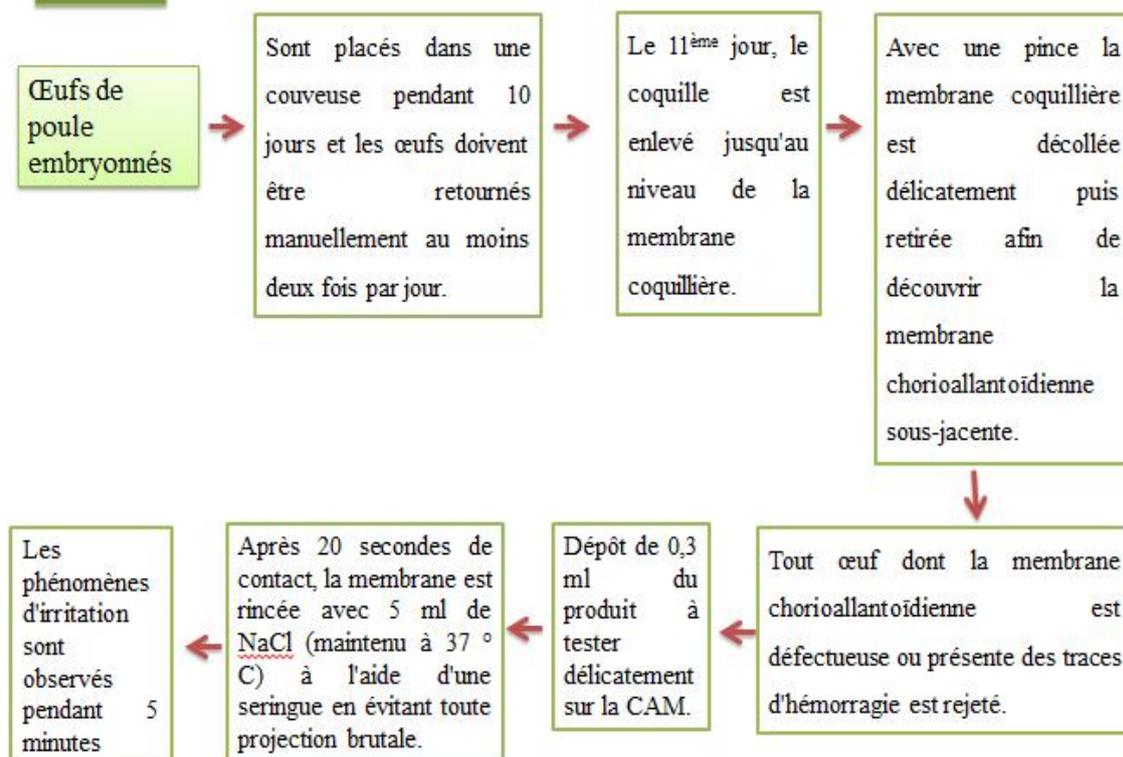
- témoin négatif : avec NaCl (temps de contact 60 secondes) ;
- témoin positif : solution de HCl 100% (**JORF , 1999**).



Figure 8 : Lecture des DO sur un lecteur de microplaques

Schéma récapitulatif de la partie matériel et méthodes



in vitro*in ovo*

III.1. Résultats

Rappelons que les tests de toxicité et d'irritation oculaire ont été réalisés dans le cadre du contrôle des produits cosmétiques (gel douche de fabrication locale, shampoing pour bébé importé disponibles sur le marché Algérien). Nous avons aussi testé des produits pharmacologiques de trois types de collyres qui sont : Mydriaticum, optiflox, optidex. Nos résultats se présentent comme suit :

III.1.1. L'étude in vivo (Le test de DRAIZE)

- L'étude in vivo par le test de DRAIZE nous a permis d'effectuer l'examen des yeux de lapins à l'aide d'un ophtalmoscope. L'aspect des yeux traités ou non avec les collyres, nous a permis l'obtention des résultats suivants :

III.1.1.1. Les collyres

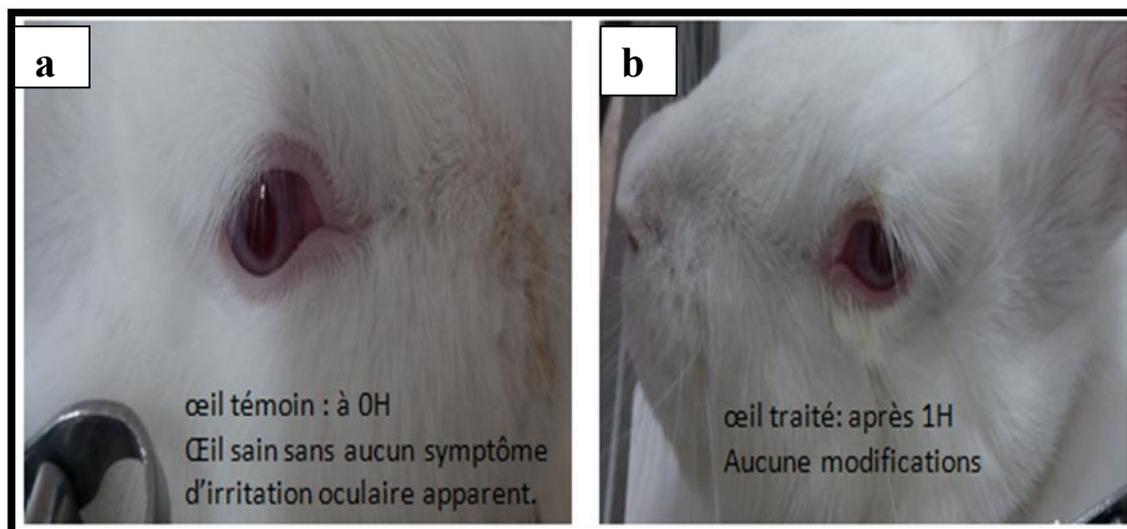


Figure 9 : Aspect de l'œil de lapin avant et après l'instillation des collyres

Nous constatons que la figure (9a) montre que l'œil sain ne présente aucun symptôme d'irritation oculaire apparent. La figure (9b) correspond à l'œil traité par les collyres après une heure d'exposition: l'œil ne révèle aucune modification.

Selon les résultats obtenus à partir de l'indice oculaire maximal calculé dans le tableau XVI (annexe III) on conclut que les collyres ne présentent aucun effet irritant sur les yeux.

III.1.1.2. Gel douche

- L'aspect des yeux traités ou non avec 100µl de gel douche, nous a permis l'obtention des résultats de la figure 10 :

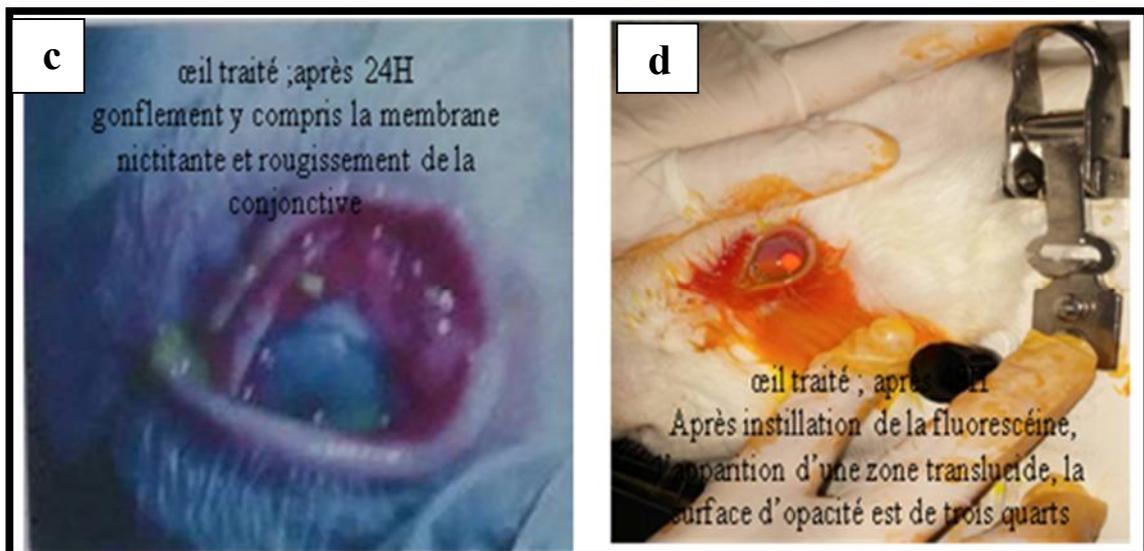
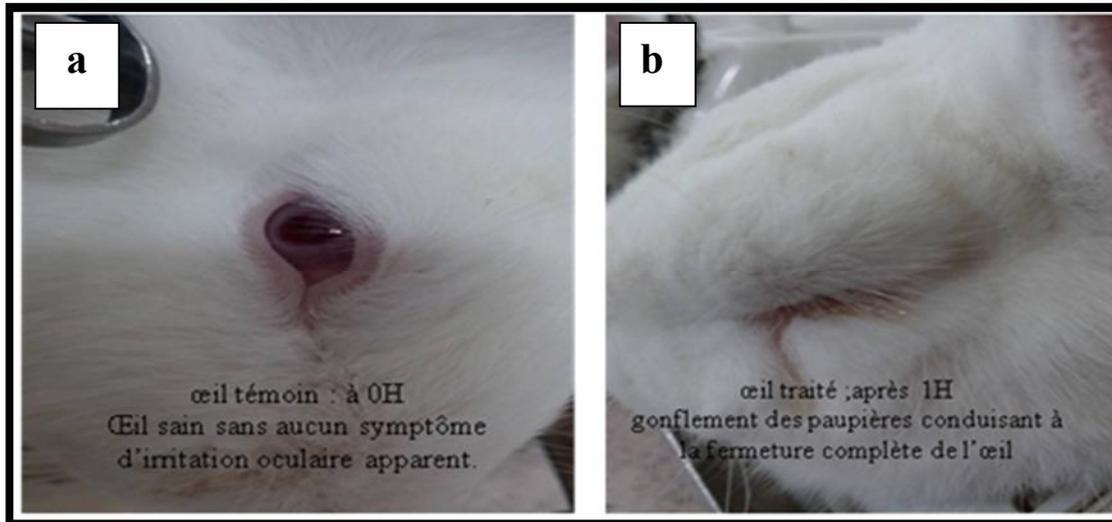




Figure 10: Aspect de l'œil de lapin avant et après l'instillation du gel douche

la figure (10 a) représentent le témoin à t_0 ou il ya absence irritation oculaire

la figure (10 b) montre que après 1heure nous avons un gonflement des paupieres conduisant à une fermeture complete de l'œil.

Après 24h, nous constatons un gonflement de la membrane nictitante et un regissement de la conjonctive de l'œil (figure10 c).

La figure (10 d) montre que : après 48h nous avons constaté une zone translucide de surface d'opacité de trois quart après l'instillation de la fluorescéine.

La figure (10 e) montre que : l'examen de la cornée a révélé une légère zone translucide avec une surface d'opacité qui couvre la moitié de l'œil, après l'instillation de la fluorescéine.

Sur la base de ces résultats obtenus, nous pouvons déduire que l'application de notre gel douche par instillation sur l'œil a engendré une irritation visible macroscopiquement au niveau soit de l'iris, de la cornée et de la conjonctive peut être due les compositions chimiques de produit.

III.1.1.3. Shampooing bébé

- L'aspect des yeux traités ou non avec 100 μ l du shampooing bébé, nous a permis l'obtention des résultats de la figure 11

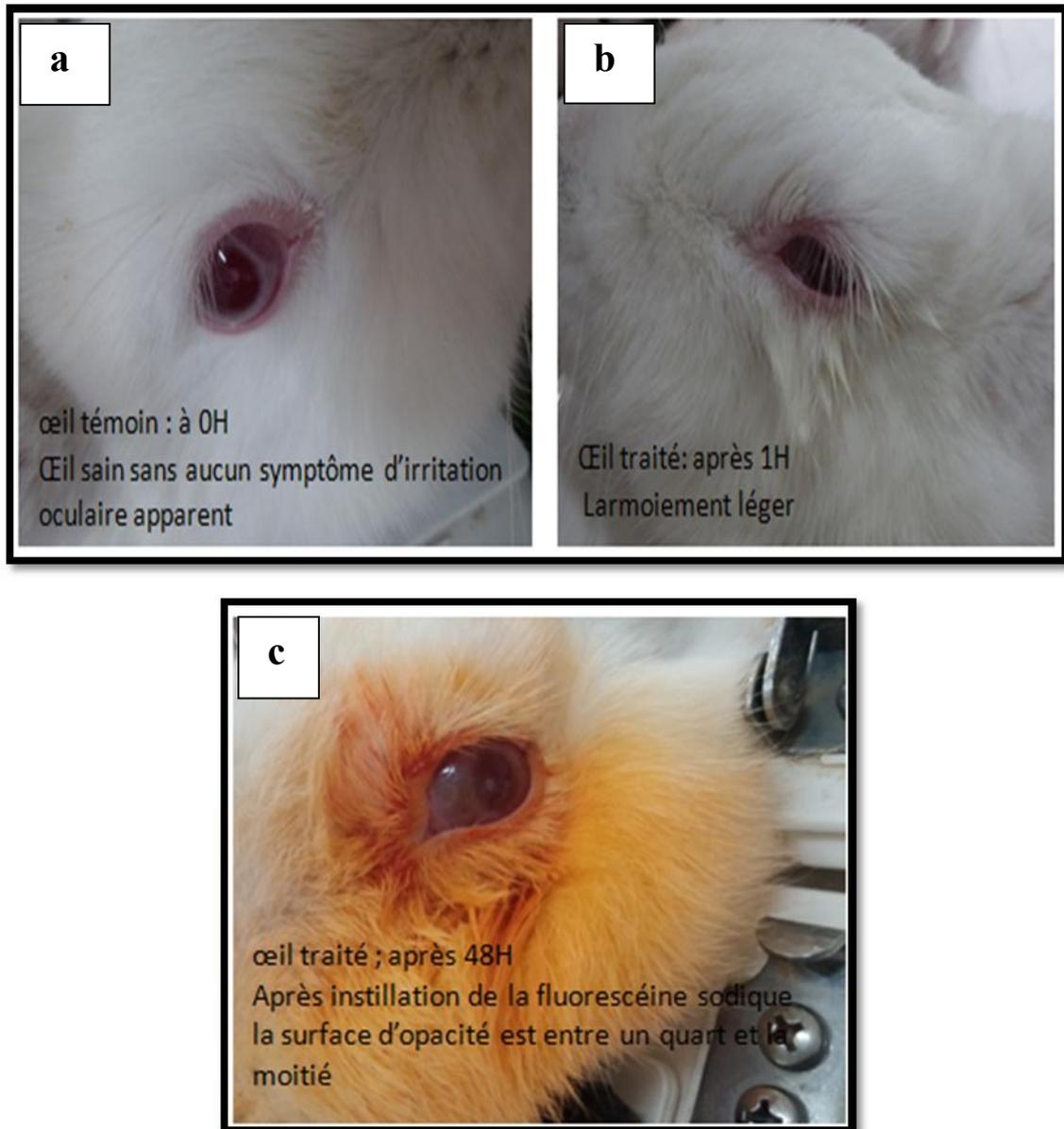


Figure 11: Aspect de l'œil de lapin avant et après l'instillation de shampooing bébé

La figure (11 a) représente le témoin à t_0 ou il y a absence d'irritation oculaire

La figure (11 b) montre la présence d'un larmoiement léger après 1 heure.

La figure (11 c) montre la présence d'une légère zone translucide avec une surface d'opacité qui est entre un quart et la moitié, après l'instillation de la fluorescéine.

Selon les résultats obtenus à partir de l'indice oculaire maximal calculé dans le tableau XX (annexe III) on conclut que le shampoing ne présente pas un effet irritant sur les yeux

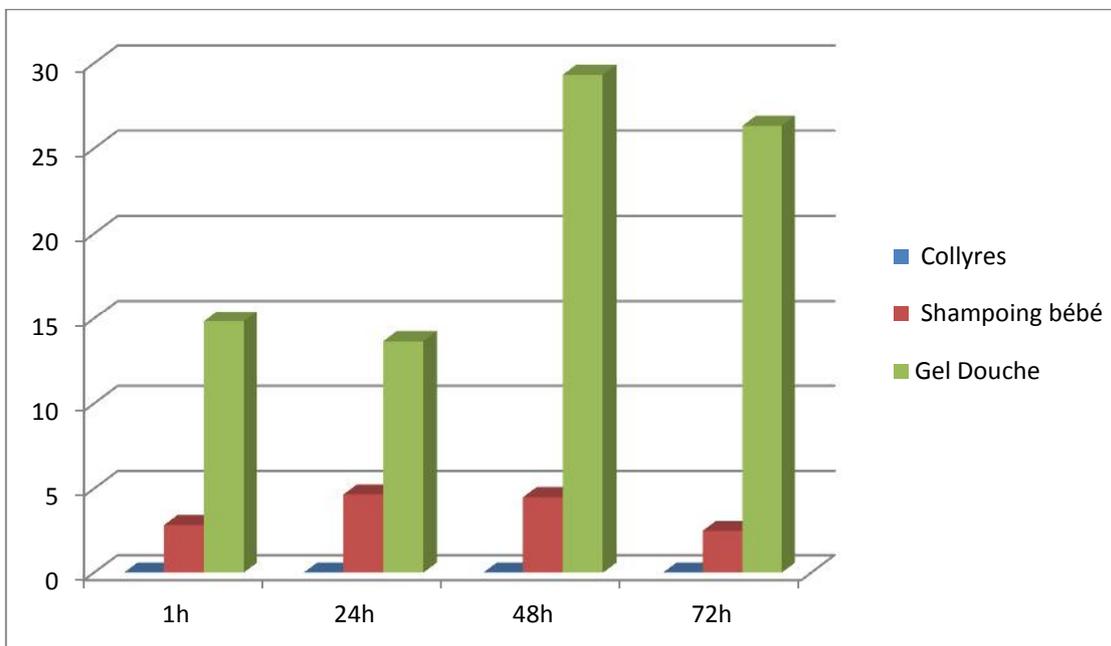


Figure 12 : histogramme qui représente les I.O.I des collyres, shampoing bébé et le gel douche en fonction du temps

III.1.1.4. Classification de produits selon les indices d'irritations oculaires maximales

Après observation et estimation des irritations des trois produits (gel douche de fabrication locale, shampoing pour bébé et collyre), les résultats sont classés dans le tableau (XVI. XVII. XVIII. XIX et XX) (annexe III).

Selon les indices d'irritations oculaires maximales calculées on peut classer notre produits en :

- Non irritants pour les trois types de collyres.
- Irritant pour le gel douche.
- Non irritant pour le shampoing bébé.

Tableau II: les indices d'irritations oculaires maximales et classification des produits.

Les produits	I.O .max	Classification
Les trois types de collyres	0.0	non irritant
Shampoing pour bébé	4.66	non irritant
Gel douche	29.34	Irritant

III.1.2. L'étude *in ovo* : Le test de HET-CAM

Les phénomènes observés à l'œil nu après application des collyres sont présentés par les figures suivantes :

III.1.2.1. collyres

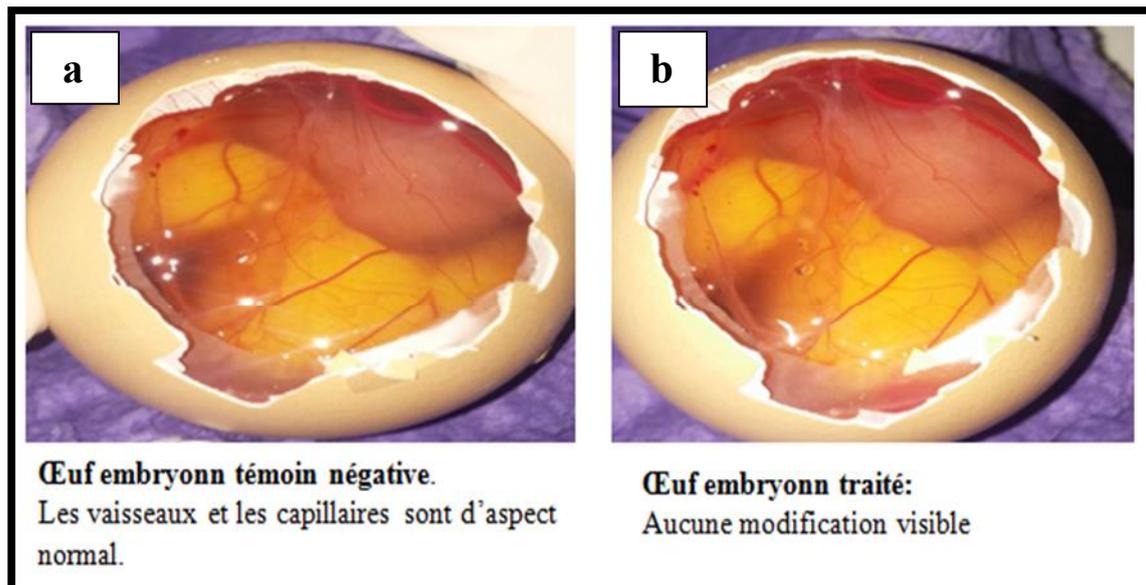




Figure 13: les phénomènes observés à l'œil nu après application de Mydriaticum sur la membrane chorioallantoïdienne.

Nous constatons que la figure (13 a) montre que l'œuf embryonn (l'œuf témoin négatif) ne présente aucun des phénomènes (d'hémorragie, d'hyperémie ou de coagulation).

La figure (13 b) qui représente l'œuf embryonn traité avec les collyres ne présente aucune modification.

La figure (13 c) représente l'œuf embryonn témoin positif traité par l'HCl, nous constatons qu'il y a présence des phénomènes d'hémorragie, d'hyperémie et de coagulation. (Dénaturation des protéines).

Selon les résultats obtenus à partir de la moyenne des phénomènes observés, on conclut que les collyres ne présentent aucune toxicité sur la membrane chorioallantoïdienne.

Les phénomènes observés à l'œil nu après application des produits cosmétiques sont présentés dans les figures suivantes :

III.1.2.2. Gel douche

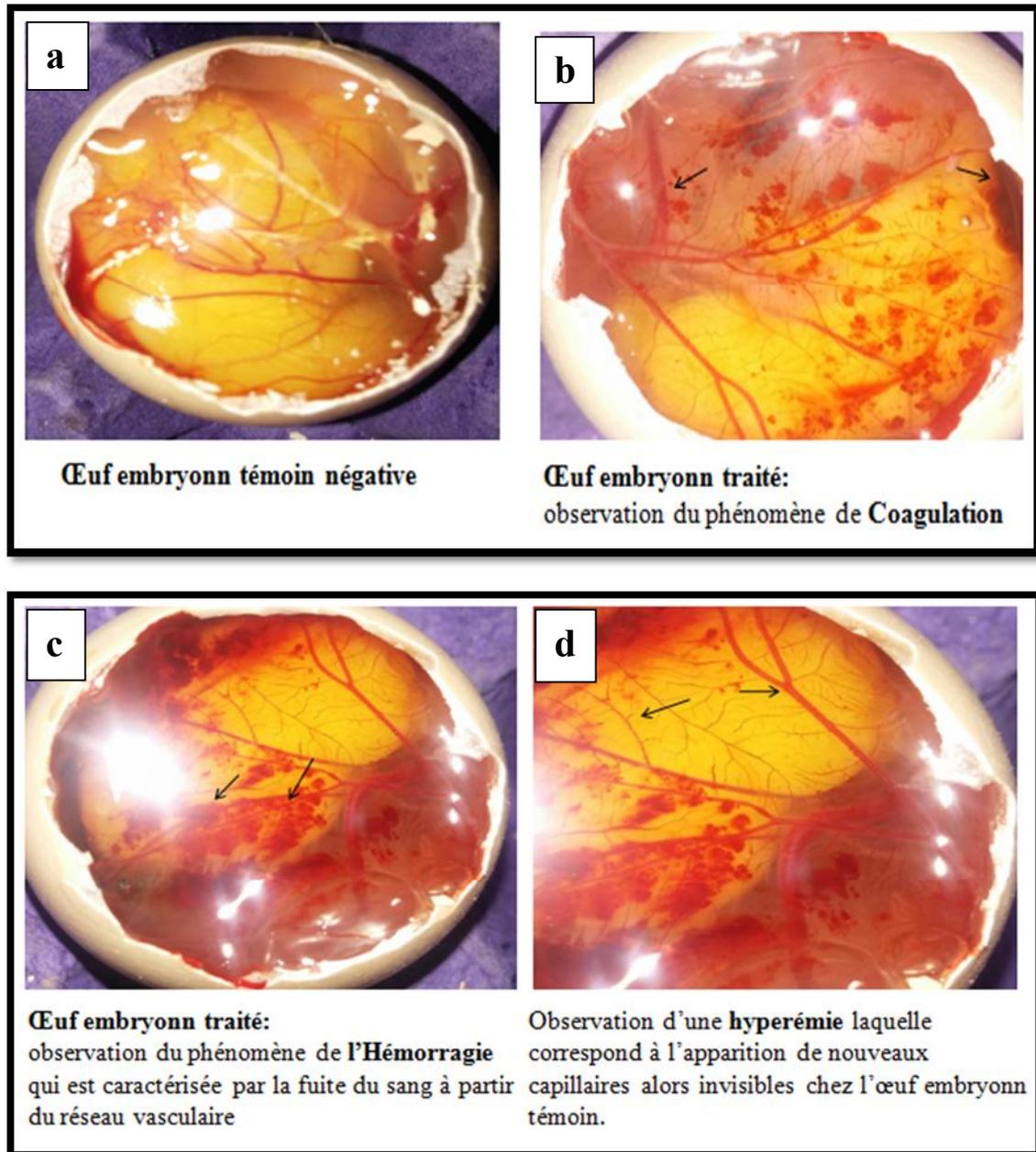


Figure 14 : les phénomènes observés à l'œil nu après application de gel douche sur la membrane chorioallantoïdienne.

la figure (14 a) représente le témoin négatif à t_0 ou il y a aucun symptômes visibles.

la figure (14 b) montre la présence d'un phénomène de coagulation après traitement avec le gel douche qui se traduit par la présence d'une thrombose (rupture du flux sanguin dans les vaisseaux).

Nous constatons dans la figure (14 c) qu'il y a la présence d'un phénomène d'hémorragie qui se traduit par libération de sang s'échappant des vaisseaux et/ou des capillaires

Et la figure (14 d) montre un phénomène d'hyperémie qui se traduit par la dilatation des capillaires et devient plus rouge et encore par l'apparition des nouveaux capillaires.

Sur la base de ces résultats obtenus, nous pouvons déduire que l'application de gel douche présente un effet irritant sur la membrane chorioallantoïdienne peut être due à leurs compositions chimiques.

III.1.2.3. Shampoing bébé

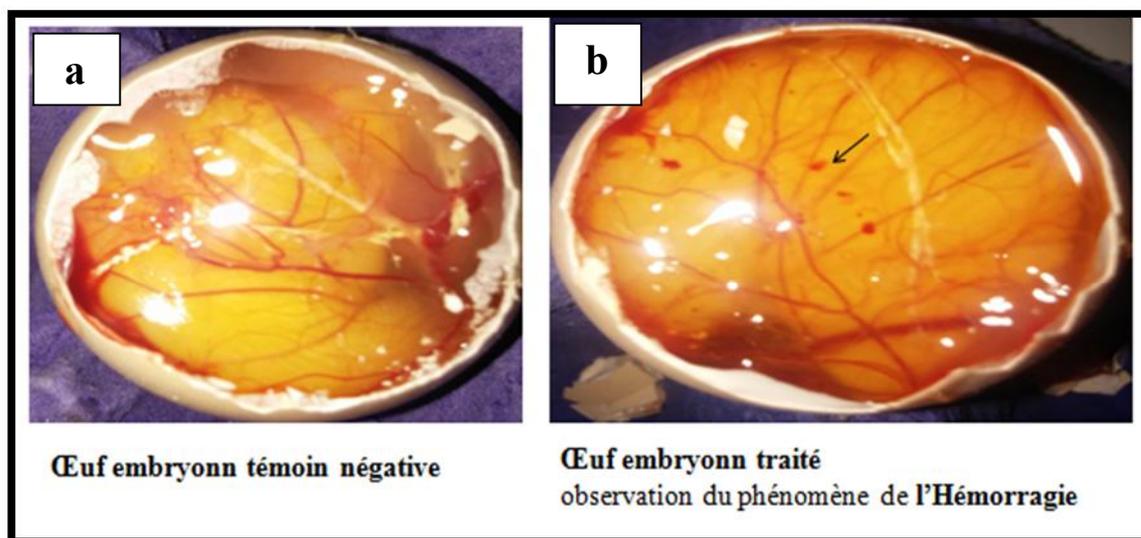


Figure 15 : les phénomènes observés à l'œil nu après application de shampoing bébé sur la membrane chorioallantoïdienne.

Nous constatons que la figure (15 a) montre que l'œuf embryonn (l'œuf témoin négatif) ne présente aucun phénomène (d'hémorragie, d'hyperhémie ou de coagulation).

La figure (15 b) traité par shampoing bébé présente une légère hémorragie.

Selon les résultats obtenus nous pouvons déduire que le shampoing est légèrement irritant, c'est peut être due à la sensibilité de test.

Les observations prises en compte pour la notation du produit sont réalisées à l'œil nu (Tableau XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV. (Annexe III).

❖ Le HET-CAM test a été utilisé pour démontrer les effets causés par les propriétés de shampoing, gel douche et les collyres. Ainsi l'altération de la CAM et son réseau de vaisseaux sanguins ont été examinés, les effets spécifiques observés sont l'hémorragie, l'hyperémie et la coagulation. L'hémorragie a été observée comme un saignement à partir de vaisseaux sanguins de la CAM vascularisée. L'hyperémie a été indiquée par apparition de nouveaux petits vaisseaux sanguins sur la CAM. La coagulation inclue une coagulation intra vasculaire (thrombose) caractérisée par la rupture du flux sanguin et/ou une coagulation extravasculaire des protéines de la CAM, ce qui a augmenté l'opacité de cette dernière. Ainsi les moyennes des notations selon les temps d'apparition de ces phénomènes ont classé:

- Le gel douche comme **irritant**
- Le shampoing bébé comme **faiblement irritant**
- Les trois types de collyres comme **non irritant**.

Tableau III : les moyennes des notations selon les temps d'apparition des effets inflammatoires (hémorragie, coagulation et hyperémie)

Produits	Moyennes des notations	Classification
Collyres	0	Non irritant
Gel douche	17.33	Irritant
Shampoing bébé	4.33	Faiblement irritant

III.1.3. Etude *in vitro* : Test de relargage de rouge neutre

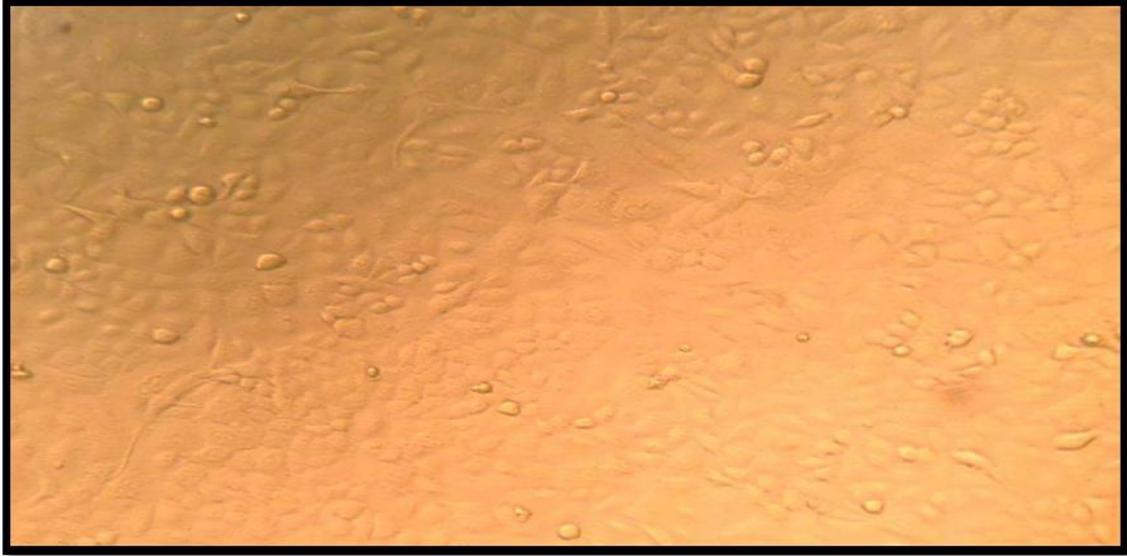


Figure 16 : observation des cellules A549 à l'aide d'un microscope à statif inversé GX40 après leur incubation pendant 3 heures avec le colorant rouge neutre à 1/80 dans le milieu de culture RPMI.

- Après incubation de 3 heures et 25sec de contact avec chaque dilution de produits et la révélation de la cytotoxicité nous avons obtenu les résultats suivants :

III.1.3.1. Les collyres

Estimation de la CI50 des collyres

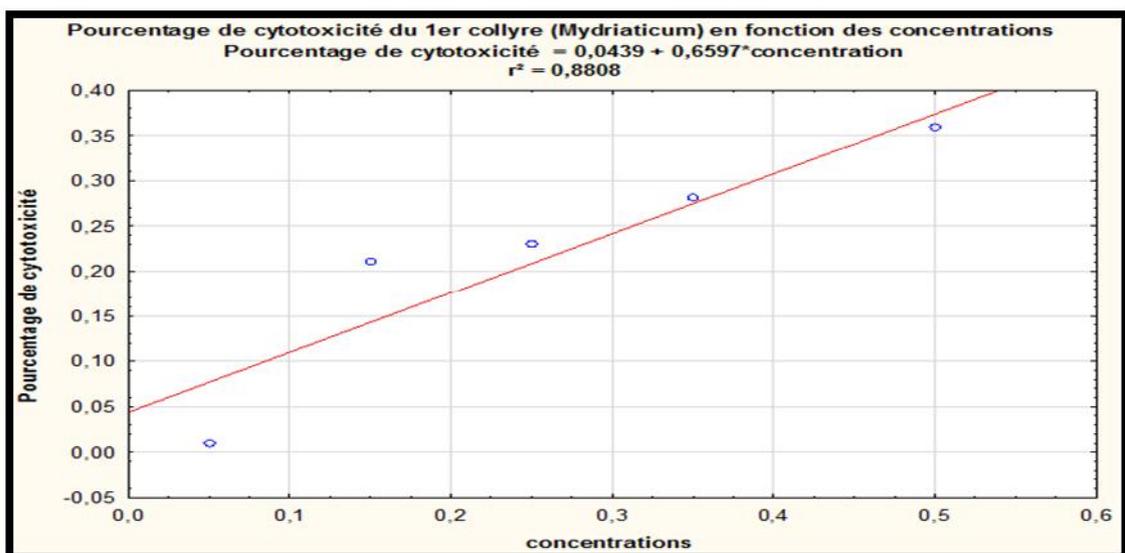


Figure 17 : graphes dose-réponse de la cytotoxicité du 1^{er} collyre (Mydriaticum) sur la

lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant rouge neutre. **Estimation de la CI50**

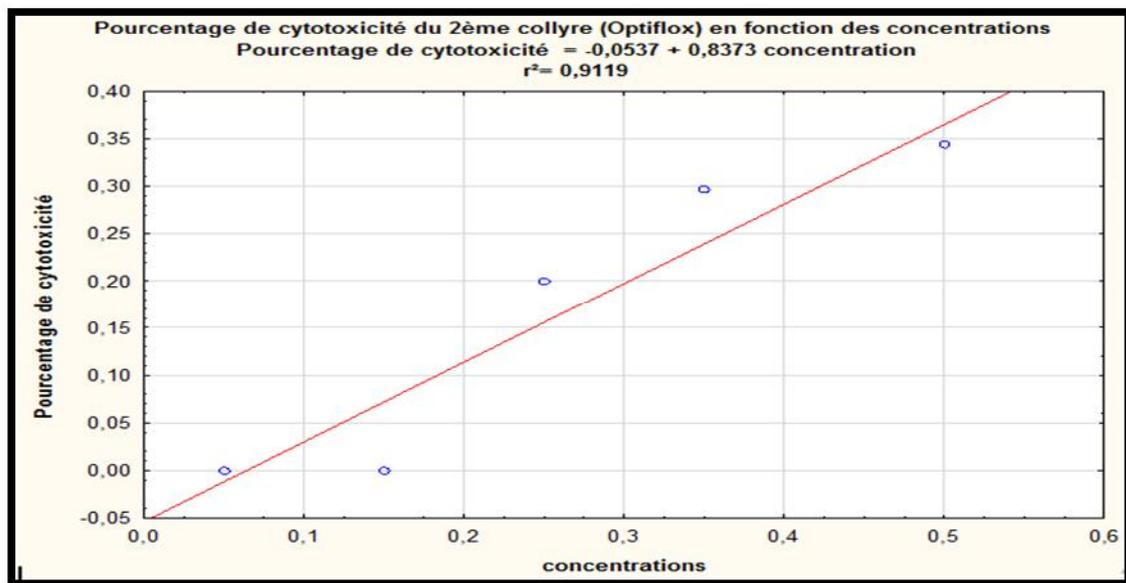


Figure 18 : graphes dose-réponse de la cytotoxicité du 2^{ème} collyre (Optiflox) sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant rouge neutre. **Estimation de la CI50**

III.1.3.3. Optidex

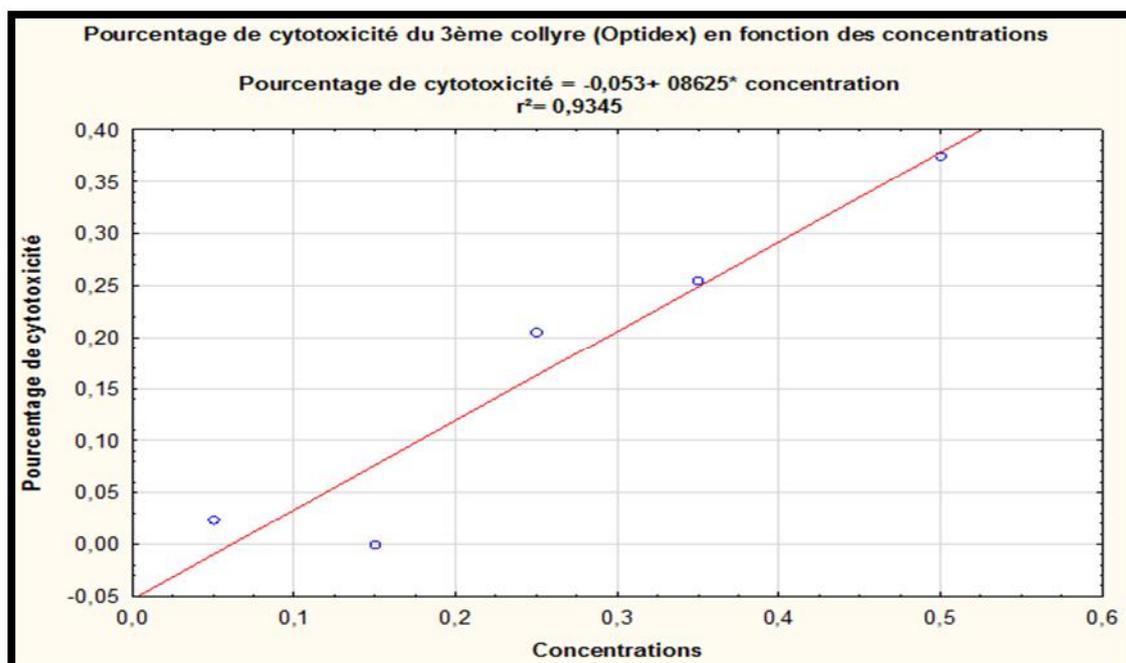


Figure 19 : graphes dose-réponse de la cytotoxicité du 3^{ème} collyre (Optidex) sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant rouge neutre. **Estimation de la CI50**

NB : CI 50 estimée de chaque collyre > 50% donc la cytotoxicité est négligeable ou peu importante ; l'étape N°2 (détermination de la CI50) non nécessaires (tableau XXVII. Annexe III).

I.1.3.4. Gel douche

Estimation de la CI50 du gel douche

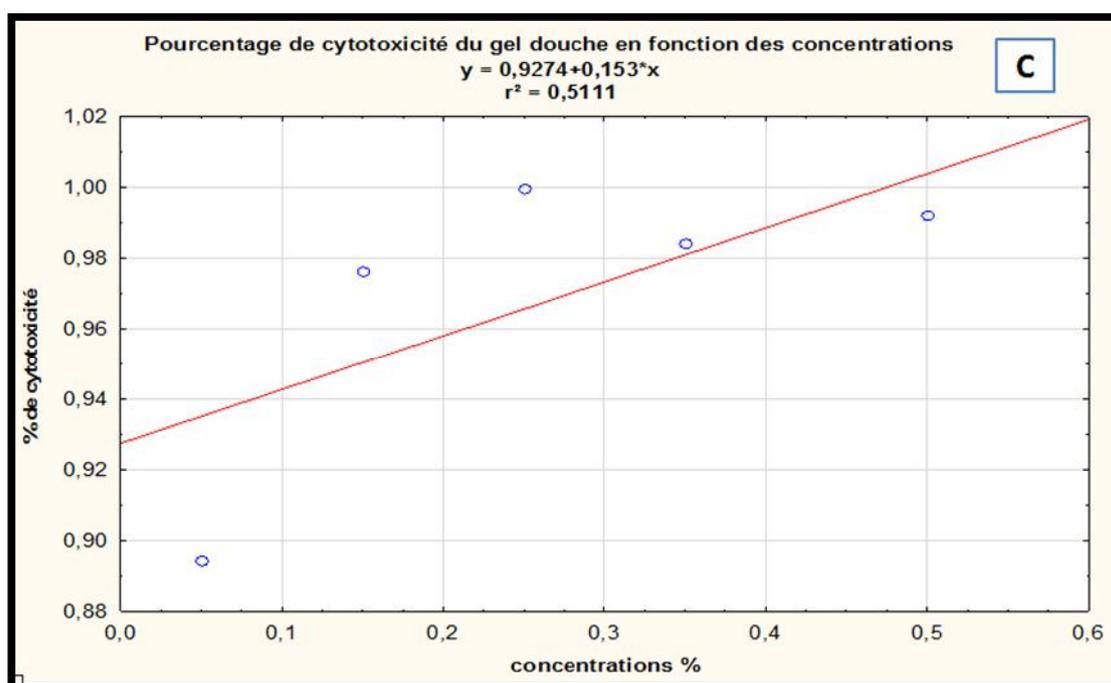


Figure 20 : graphes dose-réponse de la cytotoxicité du gel douche sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant rouge neutre. **C** : **Estimation de la CI50**

Détermination de la CI50 du gel douche

NB : CI50 du gel douche estimée < 4% donc les dilutions à préparer sont : 5%, 1%, et 0.1% (selon tableau XXVII. annexe III).

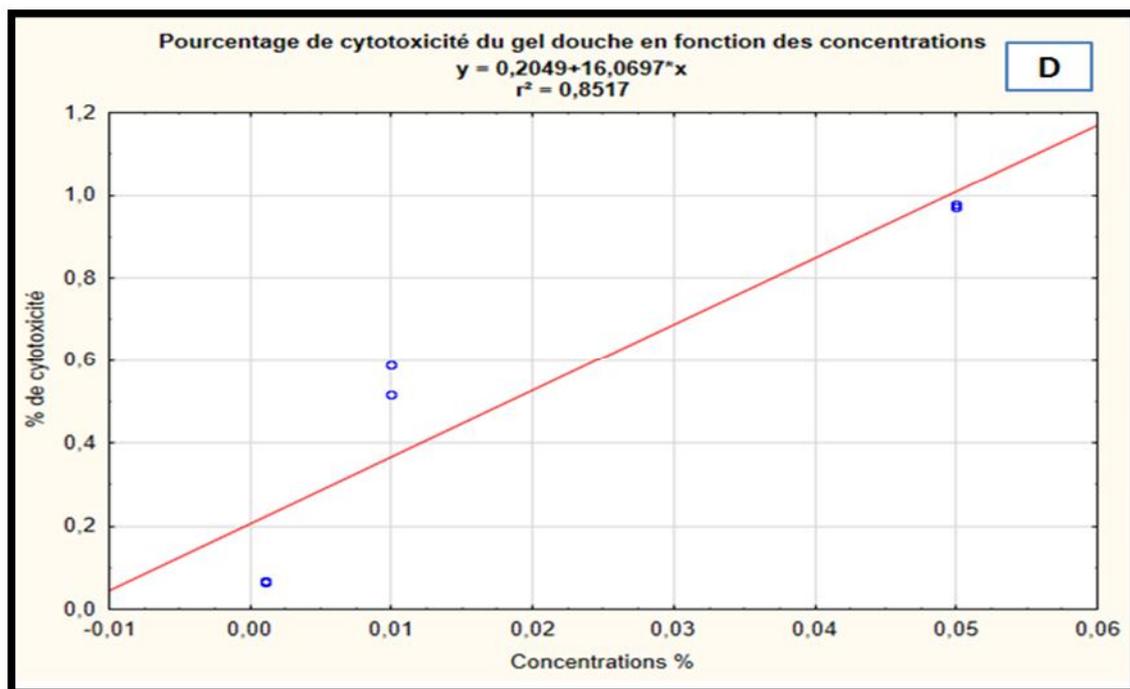


Figure 21 : graphe dose-réponse de la cytotoxicité du gel douche sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant rouge neutre. **D** : détermination de la CI50

I.1.3.5. Shampoing bébé

Les cellules A549 ont été mises en contact avec les différentes concentrations du shampoing bébé, gel douche et 3 types de collyres pendant 25 sec après leur incubation avec le colorant rouge neutre pendant 3h, les résultats sont exprimés par une courbe de pourcentage de cytotoxicité en fonction des concentrations (dilutions) des différents produits, une réponse de type effet/dose est observée.

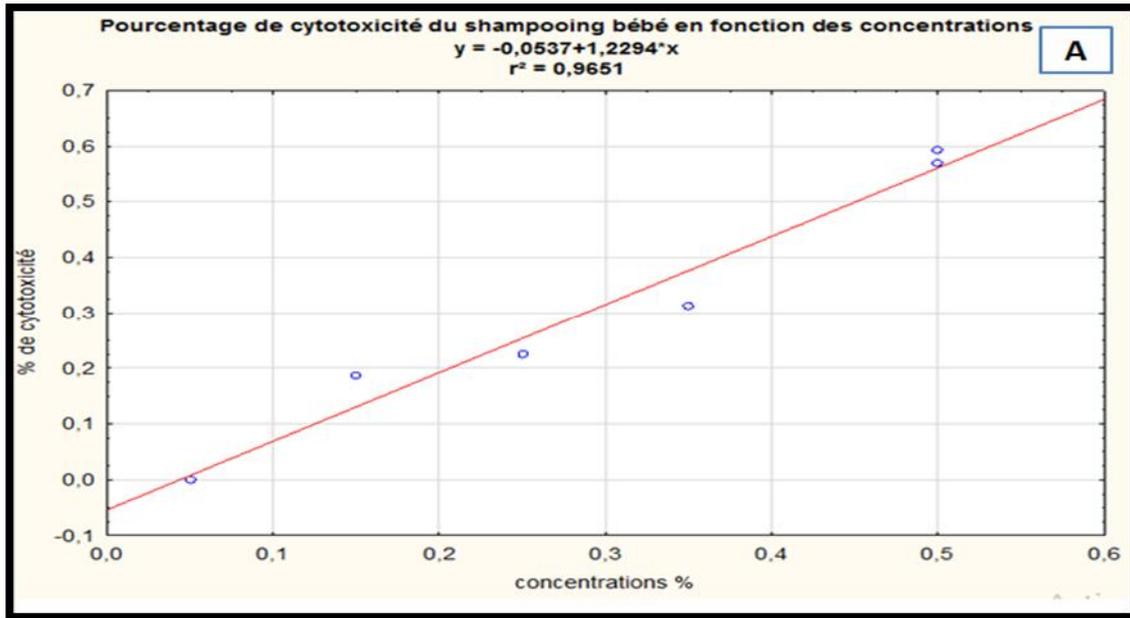


Figure 22 : graphe dose-réponse de la cytotoxicité du shampooing bébé sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant rouge neutre. **A : Estimation de la CI50**

Tableau X : Détermination de la CI50 de shampooing bébé

NB : $37 < \text{CI50 du shampooing bébé estimée} < 46$ (selon tableau N°6 annexe) donc les dilutions à préparer sont : 50%, 40%, et 35%.

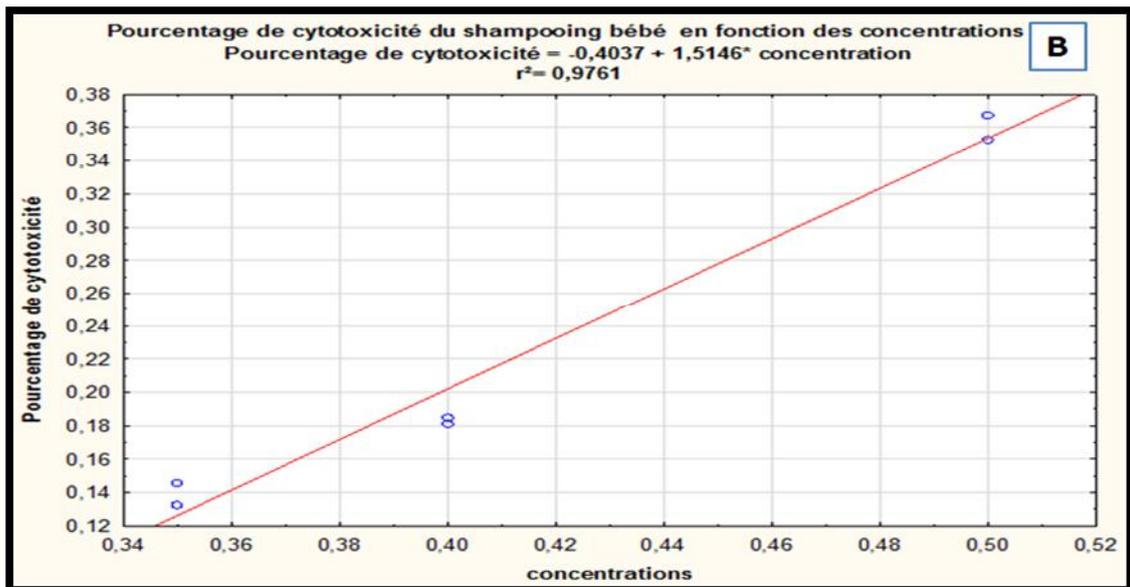


Figure 23 : graphe dose-réponse de la cytotoxicité du shampoing bébé sur la lignée cellulaire en culture A549 en utilisant le colorant rouge neutre. **B : détermination de la CI50.**

Tableau IV : Classifications des différents produits selon la CI50 déterminé (selon tableau XXVIII. Annexe III):

Produits	CI50 estimée	CI50 déterminée	Classification du produit
Collyre n°1	>50%		Cytotoxicité négligeable
Collyre n°2	>50%		Cytotoxicité négligeable
Collyre n°3	>50%		Cytotoxicité négligeable
Shampoing bébé	>37% et < 46 %	>50%	Cytotoxicité peu importante
Gel douche	<4%	≤ 25	Cytotoxicité importante

D'après les résultats précédentes nous avons constaté que les 3 collyres n'ont pas un effet cytotoxique et c'est les mêmes résultats obtenu dans le test de Draize par contre les résultats obtenus pour le shampoing bébé et le gel douche semblent plus sévères que celles de test de Draize, cela est dû à la présence d'une couche de cellules protectrices en amont des cellules épithéliales au niveau de la conjonctive et de la cornée ce qui fait que le contacte n'est pas directe contrairement au test *in vitro* ou le contact du produit à l'essai direct sur la surface des cellules A549.

Comparaison qualitative entre in vivo, in ovo et in vitro :

La classification des indices oculaires maximaux (IOM) du potentiel irritant du gel douche et du shampoing et les trois types collyres sur les trois tissus (la conjonctive, la cornée et l'iris) avec test de Draize ont été comparée à la classification prédite par le

HET-CAM test (*in ovo*) et par la lignée cellulaire (A549) dans les résultats de test *in vitro* par la détermination de la CI50 dans le test de relargage de rouge neutre. Tous les types de collyres testé ont été classés comme non irritant dans les tests *in vivo*, *in ovo* et *in vitro*, concernant le shampoing bébé considéré comme non irritant dans le test *in vivo* et de cytotoxicité peu importante *in vitro*, et faiblement irritant dans le test *in ovo*. Et ce qui concerne le gel douche a été classé comme irritant dans les tests *in vivo* et *in ovo*, et de cytotoxicité importante dans le test *in vitro*.

Tableau V: Classification des différents produits selon les différents tests

	Les collyres	Gel douche	Shampoing bébé
<i>in vivo</i>	non irritant	irritant	non irritant
<i>in ovo</i>	non irritant	irritant	Faiblement irritant
<i>in vitro</i>	non irritant	Cytotoxicité importante	Cytotoxicité peu importante

III.2. Discussion des résultats

Cette étude a comparé deux méthodes alternatives, HET-CAM et relargage de rouge neutre avec le test de Draize.

L'objectif était d'évaluer la valeur de ces méthodes comme une alternative à l'épreuve d'œil lapin comme systématiquement effectué pour tester la sécurité des produits cosmétiques et médicamenteuses.

La pertinence du test de Draize comme un modèle pour l'irritation de l'œil humain peut être critiqué et sa fiabilité est douteuse en raison de la variabilité de ses résultats. **(Weil et Scala., 1971)**. Néanmoins, il était intéressant de prendre comme référence parce qu'il est recommandé par les autorités dans le monde entier pour l'évaluation du potentiel d'irritation aiguë oculaire. **(Boue-Grabot ., et al 1995)**.

Le tableau clinique développé par les lapins suite à l'instillation de Gel douche dans le cul de sac conjonctival évoque une réaction inflammatoire aiguë. Cette dernière a été développée dès le premier contact de l'épithélium oculaire avec le produit testé, ce qui sous-entend que le mécanisme engagé n'est pas une réaction « d'hypersensibilité I » car dans la réaction d'hypersensibilité nécessite un primo-contact pour induire une réponse allergique lors de la seconde exposition.

Comme le phénomène observé ne correspond pas à une réaction d'hypersensibilité, le mécanisme responsable de l'apparition de l'irritation oculaire est d'ordre corrosif induit par les propriétés physicochimiques des tensioactifs (amphiphiles) contenus dans le gel douche qui permettent l'ancrage dans les membranes plasmiques et par la suite les interactions ioniques perturbent fortement la bicouche phospholipidique de ces membranes. Les cellules phagocytaires ou les mastocytes détecte un signal de danger et stimule la phospholipase A2 par le TNF α et IL1 ; cette enzyme transforme les acides gras (acide arachidonique) de la membrane plasmique de la cellule en leucotriènes, prostaglandines etc. Ces composés sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les macrophages, et induisent aussi l'augmentation de la dilatation des vaisseaux et leur perméabilité, facilitant l'arrivée des leucocytes sur le site de l'inflammation. Ces effets suffisent à altérer fortement les cellules épithéliales et à créer une pénétration exagérée

de fluide dans le stroma, son hydratation et le développement d'un œdème cornéen (**Monti et al., 2002**).

Sodium et ammonium lauryl sulfate sont des tensioactifs anioniques utilisés dans les cosmétiques comme agents de nettoyage. Dans l'absorption, le métabolisme, et les études d'excrétion, sodium lauryl sulfate a eu un effet dégénératif sur les membranes cellulaires en raison de ses propriétés des protéines dénaturant. Les faibles niveaux de pénétration peuvent se produire à la concentration d'utilisation élevée. (**Mary, 1983**).

Dans les tests oculaires aigus, 10% de Sodium lauryl sulfate a causé des dommages de la cornée aux yeux des lapins sinon irrigués, ou si l'irrigation a été retardée. Un test de Draize d'un produit contenant 5,1% de sodium lauryl Sulfate causé une légère irritation, et des produits contenant 21% de détergent ont été sévèrement irritante sans rinçage, et légèrement irritant lors d'un rinçage. (**Mary, 1983**).

Donc nous pouvons déduire que SLS est le tensioactif majeur qui cause l'irritation, et comme il est l'un des composé de gel douche alors le ce dernier est considéré comme produit irritant pour les yeux selon le test de Draize. Ce résultat est concorde avec les résultats de **Mary Ann Liebert**.

Les trois types de collyres et le shampooing bébé sont considérés comme non irritants selon le test de Draize.

Dans le test *in ovo* le gel douche est considéré comme irritant et le shampooing bébé comme légèrement irritant par rapport le test *in vivo* (considéré comme non-irritant) ; ces résultats obtenus montrent que le test de HET-CAM aura tendance à donner plus de résultats faussement positifs que faussement négatifs, et de ce fait il peut surestimer le potentiel irritant d'un produit mais jamais le sous-estimer, ce qui en terme de sécurité de l'utilisateur est une garantie de fiabilité (**Spielmann et al., 1993**).

La cytotoxicité des produits testés dans le test *in vitro* peut être basée sur le mécanisme physiopathologique dont l'élément déclencheur est la nécrose cellulaire. Ce phénomène touche plus particulièrement à la viabilité cellulaire par altération de l'intégrité de la membrane plasmique (**Monti et al., 2002**) ou du métabolisme énergétique mitochondrial (**Bantseev, 2003**).

Les résultats obtenus dans les tests *in vivo* et *in ovo* classent le gel douche dans la catégorie des produits irritants alors qu'*in vitro* il est révélé dans sévèrement cytotoxiques donc les résultats trouvés dans le test *in vitro* apparaissent plus sévères que la réalité clinique. Ceci peut être expliqué par la concentration du gel douche qui a été dilué après son instillation dans l'œil par le volume lacrymal basal et par la phase aqueuse de l'œuf embryonné. Cet effet de dilution observé *in vivo* et *in ovo*, a réduit la disponible du produit d'essai au niveau des cellules contrairement au modèle *in vitro* où le produit est directement mis en contact avec le système réactif.

Conclusion et perspectives :

L'œil est un organe sensible extrêmement important. Tout produit chimique entrant en contact intentionnellement ou non avec la muqueuse oculaire peut entraîner des troubles allant de la simple gêne à des lésions graves entraînant la perte de la vision. Le test de DRAIZE (1944) a été la seule technique de référence de nombreuses organisations (OCDE, ONU, UE) pour l'évaluation de la tolérance oculaire des produits chimiques sur des lapins.

Néanmoins, l'utilisation de mammifères pour ces expérimentations pose de nombreux problèmes éthiques. Le développement de méthodes alternatives est donc un sujet d'importance majeure en toxicologie actuellement et cela d'autant plus que l'UE a interdit toute expérimentation sur les mammifères pour l'évaluation des produits cosmétiques depuis juillet 2013. Tout ceci a accéléré le développement d'une politique dite des 3 R (réduction, raffinement, remplacement) dont le but est de réduire les expérimentations sur ces animaux au strict minimum. De plus, l'évaluation de la tolérance tend à suivre une approche différente avec l'utilisation de plusieurs méthodes alternatives simultanément sur le même produit afin de s'assurer à la fois, de son absence de potentiel irritant, dans notre travail nous avons évalué la toxicité de 5 produits pharmaceutiques et cosmétiques par deux méthodes alternatives (test de HET-CAM et relargage de rouge neutre) et lorsqu'il n'y a pas une grande différence entre les résultats obtenus et celles de DRAIZE ; On peut dire que ces méthodes alternatives peuvent aider à réduire les expérimentations animales mais ne peuvent pas remplacer le test de DRAIZE totalement.

L'étude évaluée reste partielle, des études plus approfondies doivent être reprises afin de mieux évaluer la cytotoxicité des différents produits comme : le dosage des cellules immunitaires pour bien comprendre les réactions immunitaires qui se déroulent, le dosage de LDH afin de valider ces tests alternatifs et réduire la souffrance des animaux.

Références Bibliographiques

A

Adolphe M., Guillouzo A. et Marano F., 1995- Toxicologie cellulaire in vitro: méthodes et applications. Edition INSERM., PP : 462.

B

Bantsev V., Mccanna D., Banh A., Wong WW., Moran KL, Dixon DG., Trevithick JR. et Sivak JG., 2003- Mechanisms of ocular toxicity using the *in vitro* bovine lens and sodium dodecyl sulfate as a chemical model. *Toxicological Sciences.*, 73(1) 98-107.

Barile FA., 2010- Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. *J. PHARM. Toxicol. Methods*, 61: 136–145.

Barlovatz-Meimon G et Ronot X., 2014- Culture des cellules animales 3^{ème} édition. Edition LAVOISIER., PP : 663.

Boue-grabot M., Bernardin G., Chaumond S et Pinon JF., 1995- Alternative methods: Hen's egg chorioallantoic membrane and in vitro cytotoxicity - a complementary approach. *International Journal of Cosmetic Science.*, 17:207-215.

Branger A., Richer MM. et Roustel S., 2012- Microbiochimie et alimentation. Edition EDUCAGRI., PP : 343.

C

Chambers WA., Green S. et Gupta KC., 1993- Scoring for eye irritation tests. *Food Chem Toxicol.*, 31:5-111.

Cholkar K., Dasari SR., Pal D. et Mitra AK., 2013- Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery. *J.Pharm. sci.*, 1-36.

Christos A., Damalas S. et Koutroubas D., 2016- Fermes' exposure to pesticide, toxicité types and ways of prevention. *Toxics.*, 4(1):1-6.

D

Dartt DA., Dana R et D'amore P., 2011- Immunology, Inflammation and Diseases of the Eye. Edition ELSEVIER., pp: 438.

Delmonte DW. et Kim T., 2011- Anatomy and physiology of the cornea. cataract refract. *Surg.*, 37(3) : 588 –98.

Références Bibliographiques

Draize JH., Woodard G. et Calvery HO., 1944- Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.*, 82: 377-390.

E

Ekwall B., 1983- Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 407: 64-77.

Eskes C., Bessou S., Bruner L., Curren R., Harbell J., Jones P., Kreiling R., Liebsch M., Mcnamee P. et Pape W., 2005- Eye irritation. *Altern Lab Anim.*, 33- 47.

F

Fancsi T et Feher G., 1979-Ultrastructural studies of chicken embryo chorioallantoic membrane during incubation. *Anat Histol Embryol.*, 8(2):9-151.

G

Gilbert SF., 2006- Developmental biology (8th Edition). Edition SINAUER ASSOCIATES SUNDERLAND., PP : 785.

Glomot R., 1986- Etude toxicologique *in vivo.*, Edition LAVOISIER. PP:385.

Gollion A., Ceppia F. et May F., 2012-Toxicite oculaire des agressifs chimiques. *Médecine et armées.*, 40(3) :273-277.

J

Journal Officiel de la République Française n°302 du 30 décembre 1999- Méthodes d'analyse nécessaires aux contrôles de la composition des produits cosmétiques. Annexe VI; texte n° 65: page 19817.

K

Kaddouci L., 2005-Corrélation entre le HET-CAM test et le test de Draize, Mémoire en vue de l'obtention le DEMS.

Références Bibliographiques

L

Lodish H., Berk A., Matsudaira P. et Darnell J., 2005- Biologie moléculaire de la cellule. Edition DE BOEK., PP : 1096.

Luepke NP., 1985- Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and chemical toxicology.*, 23(2):287-291.

Luepke NP., 1986-The hen's egg test (het)-an alternative toxicity test. *British Journal of Dermatology.*, 31(115):133-135.

Luepke NP et Kemper FH., 1986-The het-cam test: an alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology.*, 6-7(24):495 – 496.

M

Martini MC., 2011- Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. Edition Lavoisier., PP : 500.

Mary A., 1983- Final Report on the Safety Assessment of Sodium Lauryl Sulfate and Ammonium Lauryl Sulfate. *Journal of the American college of toxicology* 2(7) 1-55.

Maurer JK., Parker RD., 2000- Microscopic changes with acetic acid and sodium hydroxide in the rabbit low-volume eye test. *Toxicol Pathol.*, 28: 679-687.

Merle H., Gérard M et Schrage N., 2008-Brûlures oculaires. *Journal Français d'Ophtalmologie.*, 31(7) 723-734.

Monti D ., Chetoni P., Burgalassi S., Najarro M. et Saettone M.F., 2002- Increased corneal hydration induced by potential ocular penetration enhancers: assessment by differential scanning calorimetry (dsc) and by desiccation. *International Journal of Pharmaceutics .*, 232 (2002):139–147.

O

OECD. Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion 2012 page 19.

P

Perrot A1., Sigusch HH. Nägele H., Genschel, J., Lehmkuhl H., Hetzer R., Geier C., Leon Perez V., Reinhard D., Dietz R., Osterziel JK.et Schmidt HH., 2006-Genetic and

Références Bibliographiques

phenotypic analysis of dilated cardiomyopathy with conduction system disease: demand for strategies in the management of presymptomatic lamin a/c mutant carriers. *Eur J Heart Fail.*, 8(5) :93-484.

R

Rougier A., Cottin N., Silva O., Catroux P., Roguet R. et Dossou KG., 1994- The use of in vitro methods in the ocular irritation assessment of cosmetic products. *Toxic in Vitro.*, 4(8): 893-905.

Russell WM. et Burch RL., 1959- The principles of humane experimental technique. *Methuen.*

S

Slater DH. 1990- Fundamentals of veterinary ophthalmology. Edition Philadelphia: WB Saunders., PP: 423.

Spielmann H., 1992- HET-CAM TEST. *Invitox Protocol.*, 47.

Speilmann H., Kalweit S. Liebsch M., Wirnsberger T., Gerner I., Betaram-Neis E., Krauser K., Kreiling R., Miltenburger HG., Pape W. et Steiling W., 1993- Validation study of alternatives to the draize eye irritation test in germany: cytotoxicity testing and het-cam test with 136 industrial chemicals. *Toxicol In Vitro.*, 7(4):10-505.

Stephens ML. et Mak NS., 2013- History of the 3rs in toxicity testing. RSC., 1–39.

V

Viala A et Botta A., 2005-Toxicologie. Edition LAVOISIER ., pp : 1096.

Vinardell M. et Mitjans M., 2008- Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J. Pharm. Sc.*, 97:46–59.

W

Watsky MA., Jablonski M M. et Edelhauser H F., 1988- Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human. *Curr. Eye Res.*, 7(5):6-483.

Références Bibliographiques

Weil CS et Scala., 1971- Étude RA de la variabilité intra et inter-laboratoires dans les résultats de lapin tests oculaires et irritation de la peau. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19:276-360.

Wilhelmus KR., 2001- The Draize eye test. *Surv Ophthalmol.*, 45 (6):493–515.

Wilkie DA., 1990- control of ocular inflammation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 20: 693-713.

Annexe I: rappels bibliographiques

I. Culture Cellulaire

I.1. Repiquage des cellules

Le repiquage est comme le changement de milieu, une opération à pratiquer régulièrement pour entretenir une culture cellulaire in vitro. La plupart des cellules cultivées in vitro adhèrent au support qui leur est fourni. Quand on met en culture des cellules adhérentes cultivant en monocouche, elles prolifèrent jusqu'à former un tapis unicellulaire confluent et leur multiplication s'arrête. Pour maintenir la culture, il faut procéder au repiquage des cellules, c'est à dire leur transfert dans y de nouveaux récipients et dans du milieu neuf, à une densité cellulaire inférieure à celle de la confluence.

Protocole du repiquage d'une lignée cellulaire

Toutes ces opérations auront lieu sous hotte à flux laminaire, mise à part la numération, en respectant les conditions de « bonnes » manipulations.

1) Observation des cellules au microscope inversé

- Observer l'aspect des cellules au microscope inversé.
- Distinguer cellules mortes et cellules vivantes.
- Vérifier que le tapis cellulaire est uniforme et confluent.
- Noter la couleur du milieu.

2) Lavage du tapis cellulaire

- Éliminer le milieu par retournement.
- Laver le tapis cellulaire en introduisant 5mL de PBS sans Ca²⁺ (ou 2mL de trypsine 0,25% + EDTA pour les cellules difficiles à décoller).
- Agiter doucement le flask pendant 30sec et éliminer tout le liquide à l'aide d'une pipette Pasteur.

3) Trypsination

Les annexes

- Introduire 1,5 à 2mL de trypsine 0,25% + EDTA.
- Bien répartir sur tout le tapis cellulaire.
- Laisser agir à l'étuve.
- Examiner la bouteille toutes les 1 à 2 minutes à l'œil nu et au microscope inversé pour surveiller le décollement du tapis cellulaire du support et l'individualisation des cellules qui deviennent rondes.
- Dès que décollement et individualisation se sont produits, arrêter l'action de la trypsine.

4) Arrêt de la trypsination

- Introduire 3mL de milieu de culture complété (l'action de la trypsine est stoppée par le SVF).
- Disperser soigneusement les cellules par aspiration et refoulement à la pipette.
- A chaque refoulement, envoyer le liquide sur le fond de la bouteille pour finir le décollement des cellules.

5) Numération

- Prélever 0,4mL de suspension cellulaire dans un tube à hémolyse stérile afin de réaliser une numération en présence de 0,1mL de bleu Trypan (concentration finale: 0,2%) en cellule de Malassez.

6) Mise en culture dans de nouvelles boites (flasks)

- Calculer le volume de suspension cellulaire et le volume de milieu à introduire dans chaque bouteille de sorte que les cellules en culture sont placées à une densité finale d'environ $4 \cdot 10^4$ cellules par cm de surface (Flask de 25cm^2 de surface contenant 10 ml de milieu).
- Ajouter du milieu de culture complété à qsp 10 mL.
- Placer les bouteilles à l'étuve à 37°C et à 5% CO_2 . Dévisser d'un quart de tour les bouchons.

Les annexes

7) Entretien

- Tous les 2 jours, observer le milieu de culture et les cellules.
- Repiquer lorsque les cellules sont à confluence.
- Adapter le taux de repiquage en fonction de la vitesse de croissance de la lignée observée.
- Ne plus effectuer de numération lors d'un repiquage de routine.

I.2. Congélation et décongélation

Congélation

- A partir d'un flacon de culture, détacher les cellules adhérentes par action enzymatique (trypsine, trypsine/EDTA, etc.)
- Récupérer les cellules dans le milieu de culture complet.
- Centrifugation pendant 5 minutes, éliminer le surnagent.
- Remettre le culot en suspension dans 1 ml de milieu.
- Compter les cellules et mesurer leur viabilité par le test d'exclusion au bleu de Trypan par exemple.
- Reprendre les cellules (10^6 , 10^7 cellules/ml) dans le milieu de congélation. contenant l'agent de cryoconservation (5% ou 10% de DMSO selon le type cellulaire).
- Répartir 1 ml environ dans chaque cryotube.
- Transférer les tubes dans une boîte à congélation (toujours conservés à +4°C).
- Placer à -80°C pendant une nuit.
- Mettre dans l'azote liquide.

Décongélation

- Sortir les cryotubes de l'azote liquide en respectant les règles d'hygiène et de sécurité.
- Déposer chaque cryotube dans un bain-marie à 37°C.
- Récupérer les cellules et les placer dans 10 ml de milieu.
- Centrifuger 5 minutes entre 500 et 800g selon le type cellulaire et ôter le surnagent pour éliminer l'agent cryoprotecteur.
- Remettre les cellules en suspension dans 1 ml de milieu de culture complet.
- Dénombrer les cellules (test d'exclusion au bleu de Trypan).

Les annexes

- Selon le nombre de cellules, mettre en culture dans un flacon de 25cm² ou de 75cm² contenant respectivement 5ml ou 15ml de milieu à 37°C.
- Maintenir à l'incubateur (37°C – 5% CO₂).
- Changer le milieu après 24 heures de culture.
- Reprendre ensuite le rythme normal des passages.

Annexe II matériels et méthodes

Matériels non biologiques

- Enceinte thermostatée
- Pince anatomique droite (pince à disséquer, brucelles, ...) à bouts mousse et sans mors.
- Ciseaux à bouts ronds.
- Bain thermostaté à 37°C.
- Chronomètre.
- Boite à contention
- Source lumineuse
- Micropipette de 5 ml, 1000 μ l, 500 μ l, 200 μ l

Consommables :

- Pipettes, tubes à essai, béchers...
- Seringues de 1 ml à 5 ml.
- Système de numération de cellules
- Embouts pour micropipettes de 5 ml, 1000 μ l, 500 μ l, 200 μ l
- Tubes à essais.
- Microplaques 24 et 96 puits pour culture cellulaire.

Réactifs et solutions :

- Solution de rouge neutre à 0.05mg/ml dans le milieu de culture
- Milieu de culture nutritif RPMI liquide + Sérum de veau fœtal – SVF + Solution de pénicilline (10 000 UI/ml), plus streptomycine (10 000 μ g/ml).
- PBS (Phosphate Buffer Saline Solution)
- Solution d'extraction (1% Acide acétique glacial +Ethanol 50°)
- Eau distillé stérile.
- Solution de HCl
- Soluté injectable de pentobarbital.
- Eau pour préparations injectables.

Les annexes

- Solution aqueuse de fluorescéine sodique à (2%)
- Solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl) à 0,9%

Appareillage:

- Balance précise en mg
- Hotte à flux laminaire vertical
- Microscope inversé
- Incubateur à CO₂ – 37°C – 5% CO₂ – Hygrométrie > 90%
- Incubateur à œufs.
- Lecteur de microplaques automatique

Tableau VI: paramètres du test de Draize (d'après wilhemusK.R.surv ophthalmol.2001).

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Lapin albinos (par ex : lapins blancs de nouvelle Zélande) acclimatés à leur environnement avant le test.• Examen des animaux avant le test. Cages conçues pour éviter tout traumatisme accidentel.• 3 à 6 animaux sont en général utilisés pour chaque dose de test bien qu'un seul animal puisse être utilisé au préalable pour tester les effets des produits.• Des animaux supplémentaires peuvent être utilisés pour tester l'effet du véhicule d'un médicament si celui-ci est méconnu.• Un œil (œil gauche par définition) est désigné comme œil testé. L'œil droit est utilisé comme contrôle.• Le volume testé est classiquement de 0.1 ml par œil, mais il existe également des tests à faibles volumes (ex : 0.01 ml ou instillation d'une goutte d'environ 0.04 ml). Les composants solides sont réduits en une poudre très fine.• Pas d'anesthésie topique recommandée habituellement.• Instillation du produit testé dans le cul conjonctival inférieur ; respect du clignement(le maintien des paupières fermées quelques secondes après l'instillation est autorisé).• Parfois utilisation de sérum physiologique stérile pour irriguer la surface oculaire. |
|--|

Les annexes

- L'examen avant et après exposition au produit peut être réalisé à l'œil nu avec une bonne illumination ou à l'aide d'un ophtalmoscope.
- L'examen est également réalisé à 1, 24, 48, et 72 heures après l'exposition au produit, et parfois à 7 jours et 21 jours si nécessaire.
- Mesure des changements oculaires par graduation des lésions à l'aide d'un score notant les altérations cornéennes, des paupières, de la cornée et de l'iris.
- Des examens complémentaires peuvent être réalisés comme la mesure de la concentration de la substance testée dans un tissu ou dans les fluides oculaires.
- L'examen histologique d'œil énuclée est généralement réservé aux réactions sévères.

Tableau VII: le système de notation pour le test de DRAIZE

IO. Max	Classification
IO Max < 5	Non irritant
5 ≤ IO Max < 15	Très faiblement irritant
15 ≤ IO Max < 25	Légèrement irritant
25 ≤ IO Max < 50	Irritant
50 ≤ IO Max < 80	Très irritant
IO Max > 80	Extrêmement irritant

Tableau VIII : Scores des phénomènes observés dans le HET-CAM test

Phénomène	Temps		
	T ≤ 30s	30s < T ≤ 2min	2min < T ≤ 5min
Hyperémie	5	3	1
Hémorragie	7	5	3
Coagulation	9	7	5

Les annexes

Tableau IX: l'échelle de classification des scores de HET –CAM test

Notation (N)	Classification
$N < 1$	Pratiquement non irritant
$1 \leq N < 5$	Faiblement irritant
$5 \leq N < 9$	Modérément irritant
$N \geq 9$	Irritant

Les annexes

à 48h	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
à 72h	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	



Figure 26 : Aspect de l'œil de lapin avant et après l'instillation d'optidex

Tableau XIII: les observations quotidiennes et les indices d'irritation oculaire après l'instillation du gel douche pour six lapins.

Gel douche	Lapin	CONJONCTIVE			(A+B+C)*2	CORNEE		(a*b)*5	IRIS	Congestion réaction à la lumière « c »	c*5	I.O.I	I.O	I.O max
		Chemosis « A »	Larmoiement « B »	Rougeur de la conjonctive palpébrale « C »		Degré d'opacité « a »	Surface d'opacité « b »							
à 1h	1	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14	14.8 3	29. 34	
	2	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14			
	3	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14			
	4	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14			
	5	4	2	1	14	1	/	5	0	0	19			
	6	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14			
	1	3	2	1	12	0	/	0	0	0	12	13.6 7		

Les annexes

à 24h	2	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14	
	3	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14	
	4	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14	
	5	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14	
	6	4	2	1	14	0	/	0	0	0	14	
à 48h	1	1	2	1	8	1	4	20	0	0	28	29.3 4
	2	3	2	1	12	1	4	20	0	0	32	
	3	4	2	1	14	1	3	15	0	0	29	
	4	4	2	1	14	1	3	15	0	0	29	
	5	4	2	1	14	1	4	20	0	0	34	
6	4	2	1	14	1	2	10	0	0	24		
à 72h	1	4	2	1	14	1	4	20	0	0	34	26.3 4
	2	3	2	1	12	1	4	20	0	0	32	
	3	4	2	1	14	1	2	10	0	0	24	
	4	3	2	1	12	1	1	5	0	0	17	
	5	4	2	1	14	1	4	20	0	0	34	
6	3	2	1	12	1	1	5	0	0	17		
à 4 jrs	1	4	2	1	14	1	4	20	0	0	34	23.8 3
	2	3	2	1	12	1	3	15	0	0	29	
	3	4	2	1	14	1	1	5	0	0	19	
	4	4	2	1	14	1	2	10	0	0	24	
	5	4	2	1	14	1	3	15	0	0	29	
6	1	2	1	8	0	0	0	0	0	8		

Tableau XIV: les observations quotidiennes et les indices d'irritation oculaire après l'instillation du shampoing bébé pour six lapins.

Shampoing bébé	Lapin	CONJONCTIVE			(A+B+C)*2	CORNEE			IRIS	c*5	I.O .I	I.O	I.O max
		Chemosis « A »	Larmolement « B »	Rougeur de la conjonctive palpébrale « C »		Degré d'opacité « a »	Surface d'opacité « b »	(a*b)*5					
à 1h	1	1	0	0	2	0	/	0	0	0	2	2.8 3	4.6 6
	2	1	0	0	2	0	/	0	0	0	2		
	3	1	0	0	2	0	/	0	0	0	2		
	4	1	0	0	2	0	/	0	0	0	2		
	5	1	0	0	2	1	/	5	0	0	7		
6	1	0	0	2	0	/	0	0	0	2			
à 24h	1	3	2	0	10	0	/	0	0	0	10	4.6 6	
	2	0	0	0	0	0	/	0	0	0	0		

Les annexes

	3	3	2	1	12	0	/	0	0	0	12	
	4	3	0	0	6	0	/	0	0	0	6	
	5	0	0	0	0	0	/	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	/	0	0	0	0	
à 48h	1	1	2	1	8	0	0	0	0	0	8	4.5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	1	2	1	8	1	1	5	0	0	13	
	4	0	2	1	6	0	0	0	0	0	6	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
à 72h	1	0	1	1	4	0	0	0	0	0	4	2.5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	1	1	1	6	1	1	5	0	0	11	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
à 4 jrs	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	2	3.5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	4	2	1	14	1	1	5	0	0	19	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Résultats in ovo

Tableau XV: résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application de Mydriaticum

Mydriaticum					
Phénomènes	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	Moyenne	Classification
Hyperémie (A)	0	0	0	0	Pratiquement non irritant
Temps d'apparition	/	/	/		
Coagulation (B)	0	0	0		
Temps d'apparition	/	/	/		
Hémorragie	0	0	0		

Les annexes

(C)					
Temps d'apparition	/	/	/		
$\frac{A+B+C}{3}$	0	0	0		

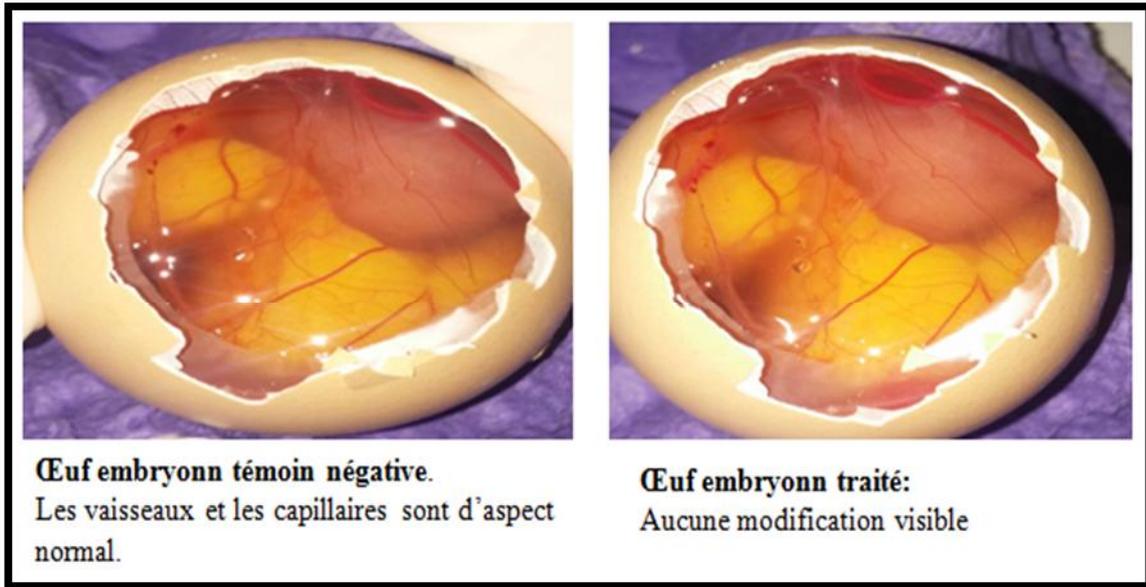


Figure 27: les phénomènes observés à l'œil nu après application de Mydriaticum sur la membrane chorioallantoïdienne.

Tableau XVI: résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application d'optiflox

Optiflox					
Phénomènes	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	Moyenne	Classification
Hyperémie (A)	0	0	0	0	Pratiquement non irritant
Temps d'apparition	/	/	/		
Coagulation (B)	0	0	0		

Les annexes

Temps d'apparition	/	/	/		
Hémorragie (C)	0	0	0		
Temps d'apparition	/	/	/		
$\frac{A+B+C}{3}$	0	0	0		

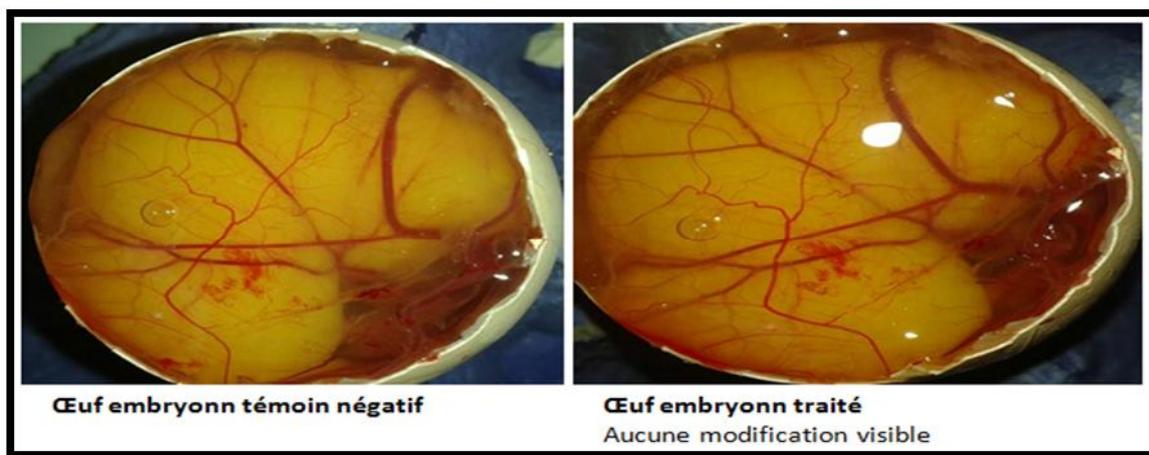


Figure 28 : les phénomènes observés à l'œil nu après application d'optiflox sur la membrane chorioallantoïdienne.

Tableau XVII: résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application d'optidex

Optidex	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	Moyenne	Classification
Phénomènes					
Hyperémie (A)	0	0	0	0	Pratiquement non irritant
Temps d'apparition	/	/	/		
Coagulation (B)	0	0	0		
Temps d'apparition	/	/	/		

Les annexes

Hémorragie (C)	0	0	0		
Temps d'apparition	/	/	/		
$\frac{A+B+C}{3}$	0	0	0		

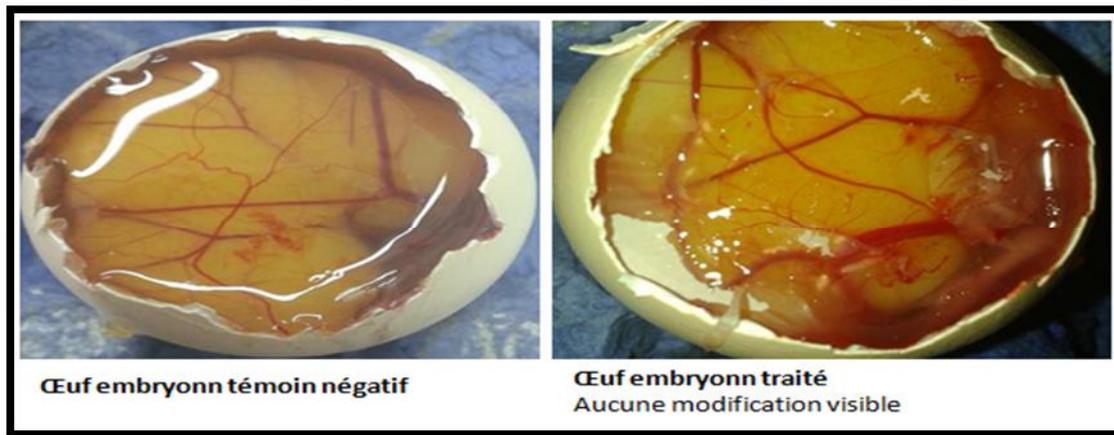


Figure 28 : les phénomènes observés à l'œil nu après application d'optidex sur la membrane chorioallantoïdienne.

Tableau XVIII: résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application de gel douche

Gel douche	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	Moyenne	Classification
Phénomènes (A)	5	3	5	17.66	Irritant
Temps d'apparition	<30 s	1 min 40s	<30 s		
Coagulation (B)	9	5	7		
Temps d'apparition	<30 s	2 min 30 s	1 min 50 s		
Hémorragie	5	7	7		

Les annexes

(C)					
Temps d'apparition	1 min 20 s	< 30 s	< 30 s		
$\frac{A+B+C}{3}$	19	15	19		

Tableau XIX: résultats des phénomènes observés à l'œil nu après application de shampoing bébé

Shampoing bébé	1 ^{er}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	Moyenne	Classification
phénomènes					
Hyperémie (A)	0	0	0	4.33	Faiblement irritant
Temps d'apparition	/	/	/		
Coagulation (B)	0	0	0		
Temps d'apparition	/	/	/		
Hémorragie (C)	5	5	3		
Temps d'apparition	1 min 40 s	1 min 50 s	3 min 20 s		
$\frac{A+B+C}{3}$	5	5	3		

Résultats *in vitro*

Tableau XX: La démarche à suivre après Estimation de la CI50 pour le test de relargage du rouge neutre

Etape N°1 CI50 (%) Estimée	Etape N°2 Les dilutions à tester 2 fois (%)		
< 4	0.1	1	5
≤ 4 ≥ 6	1	5	10
>6 et < 13	5	10	15
≥ 13 et ≤ 17	10	15	20
>17 et < 23	15	20	25
≥ 23 et ≤ 27	20	25	30
>27 et < 33	25	30	35
≥ 33 et ≤ 37	30	35	40
>37 et < 46	35	40	50
≥ 46 et ≤ 50	40	50	60
>50	Cytotoxicité négligeable ou peu importante Etape N°2 non nécessaires		

Tableau XXI: Estimation de la CI50 de Mydraticum

Les pourcentages de cytotoxicité du 1^{er} collyre (Mydraticum) et les DO (à 540 nm) en fonction des dilutions sont représentés dans le tableau suivant :

Produits	Dilutions (%)	DO (nm)	Cytotoxicité (%)
Collyre (Mydraticum)	50%	0.082	35.93%
	50%	0.082	35.93%
	35%	0.092	28.12%
	25%	0.099	23%
	15%	0.101	21.09%
	5%	0.131	1%

Les annexes

	Témoin (-)	0.128	/
	Témoin (+)	0.001	/

Tableau XXII: Estimation de la CI50 de l'optiflox

Les pourcentages de cytotoxicité du 2^{ème} collyre (Optiflox) et les DO (à 540 nm) en fonction des dilutions sont représentés dans le tableau suivant :

Produits	Dilutions (%)	DO (nm)	Cytotoxicité (%)
Collyre (Optiflox)	50%	0.252	34.38%
	50%	0.252	34.38%
	35%	0.270	29.68%
	25%	0.307	20.05%
	15%	0.426	0%
	5%	0.383	0%
	Témoin (-)	0.384	/
	Témoin (+)	0.001	/

Tableau XXIII: Estimation de la CI50 de l'optidex

Les pourcentages de cytotoxicité du 3^{ème} collyre (Optidex) et les DO (à 540 nm) en fonction des dilutions sont représentés dans le tableau suivant :

Produits	Dilutions (%)	DO (nm)	Cytotoxicité (%)
Collyre (Optidex)	50%	0.240	37.5%
	50%	0.241	37.5%
	35%	0.286	25.52%

Les annexes

	25%	0.305	20.57%
	15%	0.380	0%
	5%	0.375	2.34%
	Témoin (-)	0.384	/
	Témoin (+)	0.001	/

Tableau XXIV: Estimation de la CI50 du gel douche

Le tableau suivant nous montre les DO (à 540 nm) et les pourcentages de cytotoxicité du gel douche en fonction des concentrations du produit.

Produits	Dilutions (%)	DO (nm)	Cytotoxicité (%)
Gel douche	50%	0.001	99.22%
	50%	0.001	99.22%
	35%	0.002	98.44%
	25%	0	100%
	15%	0.003	97.66%
	5%	0.013	89.84%
	Témoin (-)	0.128	/
	Témoin (+)	0.001	/

Tableau XXV: Estimation de la CI50 de shampooing bébé

Les pourcentages de cytotoxicité de shampooing bébé et les DO (à 540 nm) en fonction des dilutions sont représentés dans le tableau suivant :

Les annexes

Produits	Dilutions (%)	DO (nm)	Cytotoxicité (%)
Shampoing bébé	50%	0.055	57.03%
	50%	0.052	59.38%
	35%	0.083	31.25%
	25%	0.093	22.65%
	15%	0.099	18.75%
	5%	0.104	1%
	Témoin (-)	0.128	/
	Témoin (+)	0.001	/

Tableau XXVI: Détermination de la cytotoxicité des produits (test de Relargage de rouge neutre)

CI50	Pourcentage de cytotoxicité observé à la dilution 50%	Classification
	≥ 20	Cytotoxicité négligeable
	$>20 \text{ et } < 50$	Cytotoxicité peu importante
$>20 \text{ et } \leq 50$		Cytotoxicité modérée
≤ 25		Cytotoxicité importante

Tableau XXVII: Détermination de la CI50 du gel douche

NB : CI50 du gel douche estimée $< 4\%$ donc les dilutions à préparer sont : 5%, 1%, et 0.1% .

Le tableau suivant nous montre les DO (à 540 nm) et les pourcentages de cytotoxicité du gel douche en fonction des concentrations du produit :

Les annexes

Gel douche		
Concentrations (%)	DO (nm)	Cytotoxicité (%)
5%	0.011	97.13%
5%	0.009	97.65%
1%	0.158	58.85%
1%	0.185	51.82%
0.1%	0.357	7.03%
0.1%	0.359	6.51%
Témoin (-)	0.384	/
Témoin (+)	0.002	/

Tableau XXVIII: Détermination de la CI50 du shampoing bébé

NB : CI50 du shampoing bébé estimée est >37 et < 46 donc les dilutions à préparer sont : 35%, 40%, et 50% (selon tableau XX).

Les pourcentages de cytotoxicité de shampoing bébé et les DO (à 540 nm) en fonction des dilutions sont représentés dans le tableau suivant :

Shampoing bébé		
Concentrations (%)	DO (nm)	Cytotoxicité (%)
50%	0.242	36.72%
50%	0.248	35.25%
40%	0.312	18.51%
40%	0.314	18.14%
35%	0.333	13.23%
35%	0.328	14.56%
Témoin (-)	0.384	/
Témoin (+)	0.002	/

ANNEXE IV : Préparation des solutions et réactifs

- **Préparation de PBS (1 litre) :**

Peser séparément : 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.15g de Na₂HP04 et 0.2g du KH₂PO₄. - Dissoudre l'ensemble des éléments pesés dans 1000 ml d'eau distillée. - Agiter à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète. - Mesurer le pH à l'aide d'un pH mètre étalonné. Le pH mesuré doit présenter une valeur de 7.4. Dans le cas contraire ajuster avec du Na OH 0.1N ou du HCl 0.1N. - Une fois l'isotonie vérifiée (pH 7.4), procéder à la mise en flacon. - Stériliser le tampon PBS par autoclavage. - Etiqueter les flacons. - Après refroidissement, Révérifier l'isotonie du tampon. - Prélever sous hotte 30ml de PBS pour le contrôle de la stérilité. - Stocker les flacons à +4°C dans le réfrigérateur.

- **Préparation de trypsine –EDTA :**

Définition de la trypsine : c'est une enzyme protéolytique qui dégrade les desmosomes et les hémidesmosomes qui lient les cellules entre elles. Par cette action, la trypsine libère les cellules à partir de la nappe cellulaire formée sur la face interne du flask.

Définition de l'EDTA : l'acide éthylène diamine tétra acétique est un complexe minéral qui potentialise l'activité protéolytique de la trypsine.

- **préparation de la solution trypsine à 0,025%** - Peser 50 mg de trypsine. - Dissoudre 50mg dans 100 ml de PBS.

- **Préparation de la solution EDTA à 0,05%** - Peser 100mg d'EDTA - Dissoudre 100mg d'EDTA dans 100ml du PBS stérile par agitation magnétique.

- **Reconstitution de la solution trypsine -EDTA** - La reconstitution de la solution trypsine - EDTA se fait lors de la filtration de la solution de trypsine à 0,1% et celle d'EDTA à 0,04%. La filtration stérilisante est réalisée en utilisant un filtre de 0,45 µm. La solution ainsi reconstituée peut être conservée à - 20°C pour une période indéterminée, comme elle peut être aussi conservée à +4°C pendant 2 à 3 semaines.

Les annexes

- **Préparation du rouge neutre :**

Peser 4 mg de rouge neutre poudre et le fait dissoudre dans 1ml de PBS, l'ensemble est agité à l'aide d'un vortex pendant 20 minutes. La solution mère de rouge neutre à 4% est dilué au 1/80 dans du milieu de culture complet puis mise à l'incubateur dix-huit heures à 5 % CO₂ et à 37 °c.

- **Préparation l'acide acétique glacial:(solution de révélation)**

1% de l'acide acétique glacial avec éthanol 50% +l'eau distillé