

# INVESTIGATION TOXICOLOGIQUE

## A) GENERALITES

### 1-But :

Évaluer le danger d'un xénobiotique

En fonction de l'utilisation : médicament, pesticide, additifs...

→ Importance et type d'études ≠

### 2- Moyens

#### a) modèles

Pertinents → extrapolation résultats au règne

##### •animaux (in vivo) :

Espèce : rongeurs, lapins, chien Beagle, primates...

→ Doit être prédictive : métabolisation !

Souche bien établie, nombre suffisant, ♂ et ♀

Charte

Souffrance : euthanasie

##### •modèles in vitro :

C\* procaryotes, eucaryotes, modèles sub-cellulaires

« Méthodes alternatives » à l'utilisation d'animaux de labo

Règle des 3 R :

Raffiner

Réduire

Remplacer

Raffiner l'étude en cours pour que l'animal souffre –

Réduire le nombre d'animaux, trouver test qui utilise le – d'animaux

Remplacer les animaux de laboratoires

#### b- Exposition

•doses : min 3 doses → effet /dose

+ Témoin (excipient)

•voie d'exposition :

Voie d'usage (si médicament)

Systémique (usage dont on est sûr que le médicament passe dans circulation sanguine)

Per os (si produit chimique, gaz → voie respiratoire)

Effet toxique les + rapides et les + importants

IV > voie respiratoire > IP > IM > Per os > voie cutanée

- Périodicité : traitement 7J/7 par administrations répétées
- Durée : 3 niveaux
  - toxicité aiguë : <24H
    - Administration unique : per os, parentérale
  - subaiguë : exposition répétée (réitérée) jusqu'à 1 mois
  - chronique : longue période de 1 mois à toute la vie

N.B. : les effets sont très souvent différents entre expositions répétées et aiguës

## c- Principales observations :

### ◆ Délai de réponse :

- effet immédiat : rapidement après l'exposition
  - Ex : CN-, inhalation d'HCN (270 ppm) → mort en quelques minutes
  - Ricine : quelque mg/kg → mort en 2 à 3 jours
- effet retardé : après un certain laps de temps
  - Ex : les effets cancérogènes : souvent après 20 à 30 ans

### ◆ Type de dommage/nature :

On cherche la symptomatologie, localisation (organe cible), troubles fonctionnels, paramètres biologiques modifiés et atteintes histologiques (étude anatomo-pathologique...)

### ◆ Réversibilité

- Réversibilité : effets disparaissant après arrêt
- Irréversibilité : effets persistants /progressant après arrêt
  - Ex : effet cancérogène

## B) LES ETUDES TOXICOLOGIQUES : « NON CLINIQUES »

Tous ce qui n'est pas l'homme

- 1- Etudes de toxicité générale
  - Atteinte générale sur l'organisme
    - par administration unique
    - par administration réitérée
- 2-Etudes spécifiques
  - sur fonction de reproduction
  - cancérogenèse
  - mutagenèse
  - tolérance locale

# 1- Etude de toxicité aiguë par administration unique

## a- Principe

Etude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qui se manifestent pendant une période donnée résultant d'une administration unique d'un xénobiotique

## b- Buts :

- Prévoir la symptomatologie après exposition massive chez l'homme  
→CAT (conduite à tenir en cas d'intoxication)
- Doses mortelles : DL 100, DL 50, DL 0  
NB : concentration létale CL /voie respiratoire  
→Classification et étiquetage
- niveau de doses des essais ultérieurs

## c- Protocole

Actuellement ∃ seulement technique in vivo

- 1/ Animal : au – 2 espèces (mammifère : rongeurs (rats, souris))
- 2/ Dose : nombre suffisant : min 3 doses →gamme de mortalité (DL 0, DL50, DL 100)
- 3/ Voie d'admin pour mdt :
  - usage prévue
  - exposition systémique →voie intra péritonéale IP  
Per os si produit chimique
- 4/ Durée : 1 administration puis observation animal pendant 14 jours  
4 h pour produit gazeux
- 5/ Etude :
  - observation périodique de l'animal  
Consommation alimentaire, hydrique; poids, comportement...  
Signes cliniques (symptomatologie)  
Condition de la mort (date...)  
Euthanasie des animaux qui souffrent  
Perte de poids =1<sup>er</sup> indice de toxicité

- Autopsie

Examen macroscopique des organes, poids des organes

si + →étude anatomo-pathologique (recherche plus précise au niveau du tissu)

## d- Résultats

Statistiques : effet pour chaque espèce, sexe, dose, voie

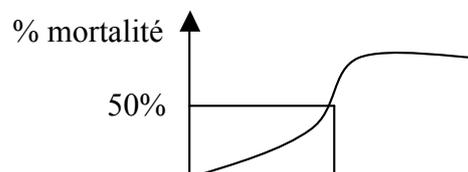
Détermination DL50

⇒Détermination de la DL50 :

- ◆ Trevan 1927

Courbe sigmoïde

→Relation dose /effet

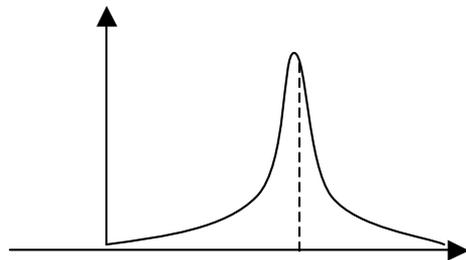


Min 200 animaux

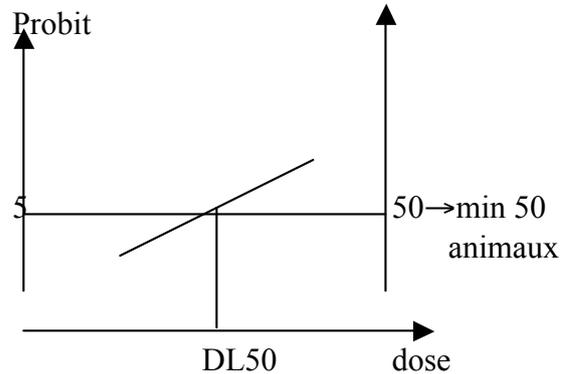
DL50 — dose mg/kg

◆ Evolution : loi normale

Frequence cumulée  
%mortalité



⇒



	-3σ	m	+3σ
Mort% :	0.5	DL50	99.5
Probit :	2	5	8

DL50 : spécifique d'1 espèce animale et de la voie d'administration

• Classification des produits chimiques en fonction d'un critère objectif : Mort

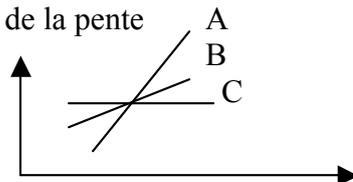
Avant : DL50 ± EC (écart type)

6 classes : DL50 per os

-extrêmement toxique >1 mg/kg → relativement sans danger >15g/kg

Mais inconvénient de la DL50

◆ Importance de la pente



A, B et C ont la même DL50 mais 3 pentes ≠tes

A est le + dangereux car en augmentant légèrement la dose, on ↑ de manière importante l'effet

◆ Surtout grande variabilité:

espèce, souche, âge, poids, sexe, aliments, hébergement...

+ mauvaise reproductibilité inter laboratoires:

80 labo / conditions standardisées:

ex: phencyclidine 74 ↔ 620 mg/kg

labo 1 labo 2

Actuellement : 3 classes

Très toxique	DL 50 per os <25 mg/kg	étiquetage T+ }
--------------	---------------------------	--------------------

Toxique 25 à 200 mg/kg T  
Nocif 200 à 2000 mg/kg Xn



↓ Niveau de précision demandé :  
⇒DL50 approximative

On s'attache + aux symptômes qu'à la mort  
→↓ Nombre d'animaux  
3 doses au lieu de 5

## e- Autres méthodes (produits chimiques)

◆ Essais limite : transport à 2 g/kg ,1 espèce ,1 sexe  
Si rien : arrêt →pas de classification  
Si mort : étude complète  
⇒Intérêt éthique

◆ Méthode de la dose fixée : 2 étapes

•étude préliminaire : choix de la dose discriminante  
4 doses pré fixées :  
→Dose qui n'entraîne pas la mort mais toxicité manifeste →on cherche  
symptômes et non mort  
5 animaux max.

•étude principale : transport à la dose choisie  
5♂ observés 14 jours  
NB : classification particulière : en fonction de la dose et des effets observés  
⇒Classification : 80 % identique au protocole classique

## 2- Etudes par administrations répétées

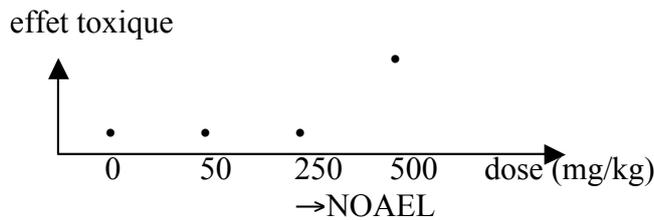
mime l'exposition dans le tps  
toxicité sub-aiguë (<1 mois) et chronique (> 3 mois)

### a- Principe et buts :

1/ Mise en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomo-pathologique consécutives à l'administration répétée du xénobiotique ⇒ « organes cibles »

2/Déterminer la limite d'innocuité expérimentale

NOAEL =No observe adverse effect level  
Ou DES dose sans effet  
= valeur toxicologique de référence



## b- Protocole :

◆ Animal : médicament → au moins 2 espèces (dont 1 n'est pas un rongeur : chien Beagle\*\*\*ou primate)

- rongeur : 10 à 20 animaux /sexe /dose  
+ 5 A/sexe/dose pour réversibilité
- non rongeur : 4 à 6 A/sexe/dose +2

◆ Durée : médicament → en fonction des essais cliniques :

Durée des études cliniques (H)	Durée min des études de toxicité par administration répétée (animal)
1J	2 semaines
Jusqu'à 2 semaines	1 mois
Jusqu'à 1 mois	3 mois
Jusqu'à 3 mois	6 mois
> 3 mois	6 mois rongeurs ,9 mois non rongeurs

Sécurité : durée + longue chez l'animal (≠ USA, Japon)

- ◆ Dose : 3 + 1 lot témoin (excipient) en ml/kg
  - Dose forte : dose max. tolérée
  - Dose faible : effet pharmacologique ou concentration plasmatique
  - Dose intermédiaire : moyenne
- ◆ Voie d'administration : médicament → sage prévu (per os)
- ◆ Fréquence : 7J/7
- ◆ Etude : →examens à To puis périodiquement (tous les J, semaine ,15J... )
  - surveillance de l'animal :
    - consommation alimentaire ,hydrique ,comportementale
  - Examens cliniques : poids, température, symptômes
  - Examens biologiques : bilan sanguin, biochimique, urinaire..)
  - Examens para cliniques : ECG ,bilan radiologique, ophtalmo  
(pas obligatoire, sur choix du clinicien)
  - Fin :Euthanasie (sauf réversibilité :Euthanasie + tardive (~4 semaine ou 8 si traitement de 9 mois)  
-Autopsie :

+ de 40 organes et tissus examinés : poids , examen macroscopique  
inclusion dans blocs de paraffine puis examen anatomopathologique → lésion /tissu/animal

◆ Etude statistiques : lot/témoin  
effets induits par le traitement ;  
→ organes cible , effet/dose, sexe, durée, réversibilité  
⇒ NOAEL éventuelle

## C) ETUDES SPECIFIQUES :

### I- Etude des fonctions de reproduction

Pendant longtemps ,placenta = barrière

Mais :

• Agents physiques : Nagasaki , Hiroshima  
→ 25% des enfants nés vivants de mères irradiées → anomalies du SNC

• Cas du virus de la rubéole  
Epidémie en Autriche en 1941  
→ + de 20000 enfants ont eu malformations (cœur, yeux et oreilles)  
+ retard mental

#### ◆ Cas de la Thalidomine :

□ PA mis sur le marché en 1956, utilisé comme sédatif et entre nausées pendant grossesses

- En 1960 : ↑↑ malformation exceptionnelles :  
Phocomélie (raccourcissement des membres)  
Amélie (absence de membres)

→ ~10000 enfants nés mal formés

- Fin 1961 : arrêt de la commercialisation

#### ◆ Cas du diéthylstilbestrol :

→ 400 cas de cancer chez les filles de mères traitées (1946- 1970)

160000 filles

Nécessité absolue d'un haut niveau de sécurité

#### Buts :

- Information en particulier sur :
- état des gamètes
- aptitude à l'accouplement
- fécondation\*
- nidation, implantation
- embryogenèse
- croissance in utero
- parturition (accouchement chez l'animal)

- lactation, sevrage
- effets tardifs sur la progéniture

## Protocole :

### Animal :

Espèces identiques à l'étude par administration répétée, manipulation aisées, nombreuses portées et temps de gestation courts

Le + souvent :

- rongeurs : rat → gestation 21 à 22J ,14 petits /portée
- non rongeurs : lapin→gestation 28 à 34J ,8 animaux/portée

### Doses

1 lot témoin + 3 doses :

dose la + forte

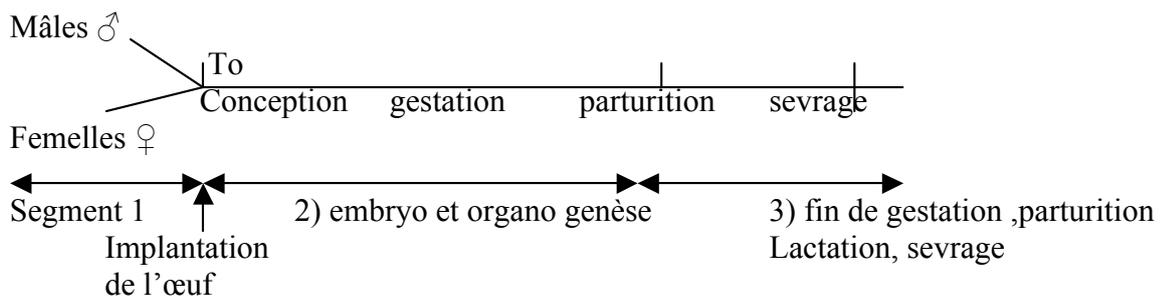
- toxicité pour la mère =perte de poids de -10%
- pas embryolétale (effet tératogène masqué ?)
- pas trop faible (au dessous du seuil efficacité =toxique)

Dose la + faible =effet recherché

### Voie :

Voie urinaire en thérapeutique, sinon per os...

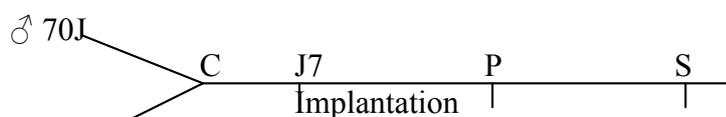
a. Etudes :3 segments



◆ segment 1 :Etude de fertilité et du développement embryonnaire précoce

1 espèce :rongeur (rat) :24 ♂ et 24 ♀/lot

[♀ traitée x ♂ non traité et ♀ non traitée x ♂ traité] ou [♀ traitée x ♂ traité]



Suivi des ♀ ,♂ :

- poids
- Comportement
- Consommation
- Symptomatologie

Fin d'étude :

- 1/2 ♀ gravides : césarienne à la fin de la gestation : 21J
  - nombre de fœtus ms, vivants,
  - sexe, poids, examen morphologique
  - Index de Fertilité : ♀ gestantes / ♀ non gestantes
- 1/2 mettent bas normalement : nombre, sexe, mortalité

Suivi des petits (F1) : - poids

- développement moteur et comportement

Suivi jusqu'à F2 (F1 x F1)

- Sacrifice des mères et des pères :  
examen spécial des organes génitaux

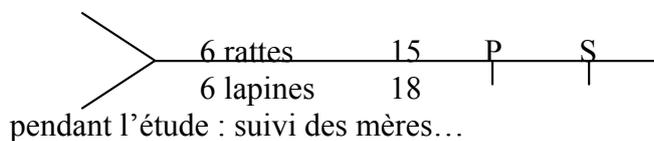
◆ S2 : Développement embryofœtal : embryo et foeto toxicité

« évaluation du pouvoir tératogène »

au moins 2 espèces rongeur : 20 ♀ / lot

Lapin albinos : 12 / lot

Traitement : pendant la période d'organogenèse



Fin de l'étude :

Césarienne 24H avant de mettre bas (cannibalisme) : rattes J20, lapines à J28

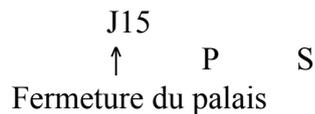
• nombre de fœtus vivants, morts

• poids, taille, sexe, aspect...

• anomalies morphologiques (viscères, squelette) et histologique (coloration spécifique)...

◆ S3 : Développement péri et post natal

1 espèce rongeur : 12 ♀ / lot



Pendant l'étude :

• 1/2 portée est sacrifiée (avec les mères) : examen...

• 1/2 : pour les effets retardés :

- suivi de la génération F1, viabilité,

- évolution pondérale,

- développement physique, fonctionnel, comportemental,

- évaluation des capacités de reproduction

⇒ Pour chaque segment : étude statistique / lot témoin

## D) CONCLUSION

Pb d'extrapolation de l'animal à l'homme

Pas de modèle animal satisfaisant

Ex : Thalidomine

Tératogène chez l'homme : 5 à 1 mg/kg

Chez le rat, souris : 4 g/kg = rien

Chez le lapin et le hamster : 1 mg/kg

Légère embryopathie

→ Seules certaines souches de lapins blancs sont très sensibles c'est pourquoi on demande test sur rat et sur lapin mais possibilité de toxicité sur autre espèces

⇒ L'extrapolation nécessite la + grande prudence !

Exemple de produits tératogènes :

Diéthylstilbestrol, éthanol, cocaïne, radiation ionisantes

Mercure organique, isotrétinoïne, antiépileptique, chloroquine, antinéoplasique...

L'isotrétinoïde : utilisé contre l'acné

# ETUDE DE LA CANCEROGENESE

## A) INTRODUCTION

Cancérogénèse chimique : cancer induit suite à une exposition à un produit chimique (idem physique)

Repose sur plusieurs faits :

- 90 % des cancers sont des cancers épithéliaux (en contact avec l'extérieur : peau, poumon, tractus gastro intestinal...)
- épidémiologie : exemples

1775 Percival Pott → chez les ramoneurs, ∃ ↑° des cancers du Scrotum

1916 : suie = goudron de houille

peau de lapin → cancer

1920 : identification du contenu = HAP dont B[a]pyrène

1895 ↑° des cancers des voies urinaires chez ouvriers teinturiers

→ colorants de synthèse : amines aromatiques

1950 : x10 leucémies : radiologues

- Lien entre analyse de mutation (ex : gène p53) et la carcinogénèse

Mutation sur un codon spécifique due à :

Aflatoxines B1 et hépatocarcinome

Tabac et cancer broncho-pulmonaire

UV B et cancer cutané

- à ce jour : CIRC : 836 produits étudiés sont cancérogènes chez l'homme 75

28 produits chimiques, physiques, processus industriels

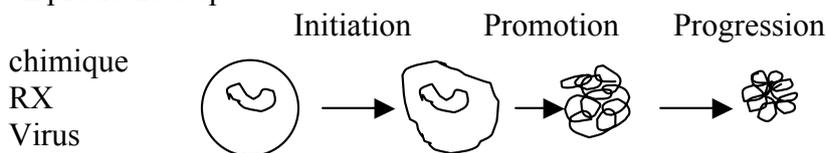
25 médicaments

5 habitudes (tabac...)

7 produits biologiques (virus...)

## B) PROCESSUS

en plusieurs étapes



1/ Initiation : Agent génotoxique

c\* normale → c\* initiée (potentiellement maligne)

⇒ Altération irréversible du génome (si pas réparé)

2/ Promotion : Agent promoteur de tumeur (épigénétique)

c\* initiée → Prolifération → X c\* immatures  
hyperplasie                      dysplasie                      cancer in situ

⇒Expansion clonale d'une c\* dont le génome est altéré

3/ Progression :facteurs génétiques ou épigénétiques  
envahissement des tissus voisin →ganglions satellites  
→métastase cancer invasif

•Evènement rare =0.1% des c\* arrivent au terme de ce processus  
min 2 à + mutations sur une même c\* pour qu'il y ait évolution

## C) MECANISME

•agents génotoxiques → interaction avec ADN

1/ Mutation : génique :substitution, délétion, addition  
Chromosomique : modification de structure → macrolésion  
Modification de nombre

2/ Réparation : pas de réparation  
réparation fautive  
division cellulaire avant réparation

→altération permanente de l'ADN

Il faut des mutation permanentes pour qu'un cancer survienne

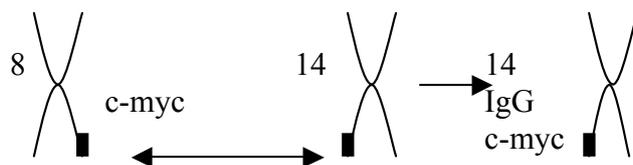
**Gènes cibles :**

1/ Proto oncogènes :régulateurs de la croissance et division

Mutation →activés en oncogène →↑↑ division c\*α

→gain de fonction =activation

ex :c-myc cancer du poumon à petites c\* : amplification jusqu'à 50 x c-myc  
Lymphome de Burkitt :translocation



2/ Gènes suppresseurs de tumeurs :gardien de l'intégrité du génome

⇒perte de fonction =inactivation

ex : p53  
Brac 1 et 2

Facteurs épigénétiques :

→cytotoxicité, inflammation chronique

→environnement c\*α :hormone, facteurs immunologiques

→promoteurs :mécanisme ?

→définit comme ↑ incidence...

### 2- Investigations toxicologiques



- Avantages : ↓↓ tps  
↓ nombre d'animaux → ↓ coût  
même localisation des cancers que sur le modèle à long terme
- Inconvénients : souris p53 : mise en évidence seulement composés génotoxiques  
trop sensible ? mise en évidence + de produit + que sur étude de  
cancéro-translation  
p53 peu impliqué dans la cancérogenèse du rongeur (famille gène rats  
touché et non p53)  
en cours de validation : protocole pas encore stricte ou codifié  
(variable)  
Coût ~1m° € peu par rapport étude clinique mais quand même cher

# ETUDE DE LA MUTAGENÈSE

## DEFINITION

- Agent mutagène → agent physique ou chimique capable de provoquer une mutation dite « induite »
- Mutagenèse → processus qui produit une mutation
- Mutation obtenues naturellement = mutants spontanés

## LES DIFFERENTS TYPES DE MUTATION

### I- Mutation génique → 1 à plusieurs paires de base

Substitution ,délétion ,insertion de bases

### II- Mutation chromosomiques = macrolésion

gènes, segments de chromosomes ou chromosomes entiers

- Altération de la structure : exemples
  - délétion et insertion d'un segment d'ADN (de qlq pb à des millions de pb)
  - cassures : simple brin ou double brin
    - discontinuité de la double hélice : agent clastogène (casse les fragments d'ADN)
- Variation du nombre
  - aneuploïdie → agent aneugène (variation nombre  $\pm 1$  chromosomes)
  - polyploïdie :  $2n, 3n$

système de réparation

Si anomalie importante → mort  $c^* \alpha$

## INVESTIGATION TOXICOLOGIQUE

But : prédire la cancérogenèse (1ère étape = mutation : atteinte ADN)

→ test rapides, sensibles, peu onéreux

Tests in vitro et in vivo

- . dossier AMM : bactérie réglementaires : min 3 tests
  - test de mutation génique → mev de  $\mu$  lésions
    - ⇒ Test d'Ames sur bactérie sur  $c^*$  procaryotes
  - Test in vitro de mutation génique et chrsq sur  $c^*$ 
    - ⇒ Test du Mouse Lymphoma Assay (MLA)
  - Test in vivo de mutation chrsq
    - ⇒ Test du micro noyau in vivo

bactérie min si prod - , si 1 test + → autres tests

### 3.1 Test d'Ames :

test de mutation génique réversible sur bactérie (ut bact mutantes ,obs effet mutagène par passage de mutantes à sauvages

•**Souches bactériennes :**

Salmonella tryphimurium modifiées :His – (incap \$ his)

Pls types :

Mutation /décalage de l'ORF

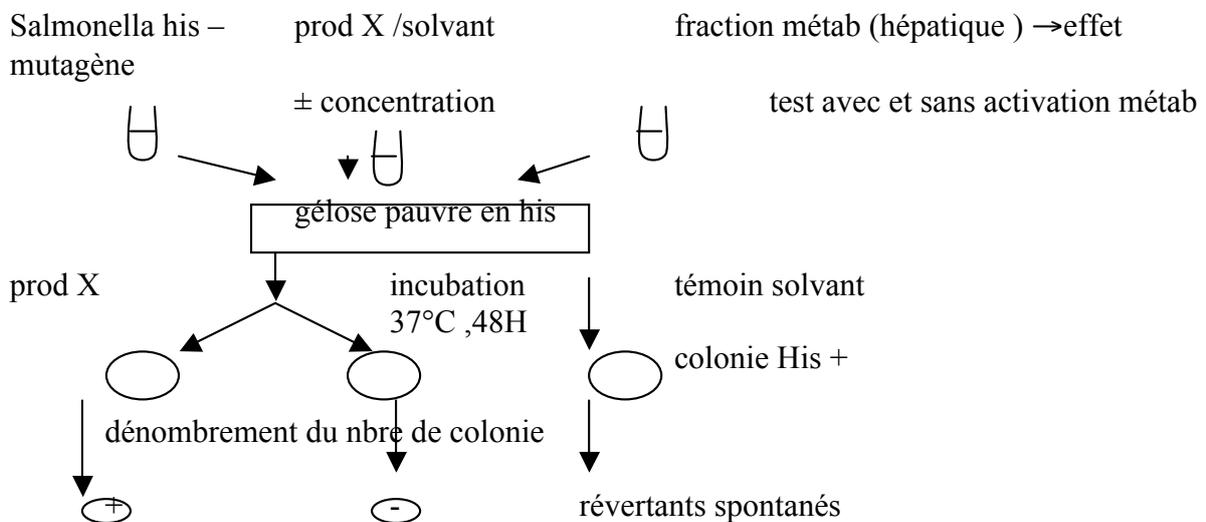
Mutation /substitution

Délétion de syst de réparation

↑ sensibilité

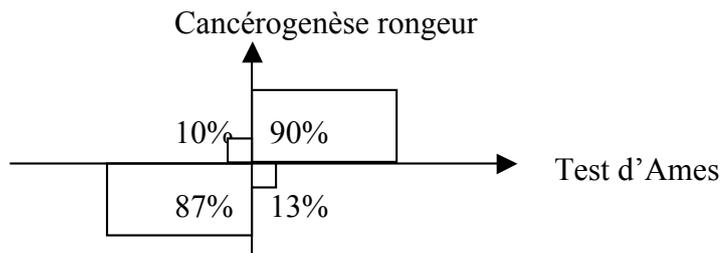
Perméabilité mbα ↑

•**Protocole :**



→tte colonie cap de se dyper en – de 48H sur milieu pauvre en his

⇒**Corrélation mutagenèse /cancérogenèse**



→90% des prod + ds Ames sont cancérogènes chez le rongeur⇒VP

87% des prod – sont non cancérogènes ⇒VN

13% des + ne sont pas cancérogènes ⇒FP

10% des cancérogènes ne sont pas + /Ames ⇒FN

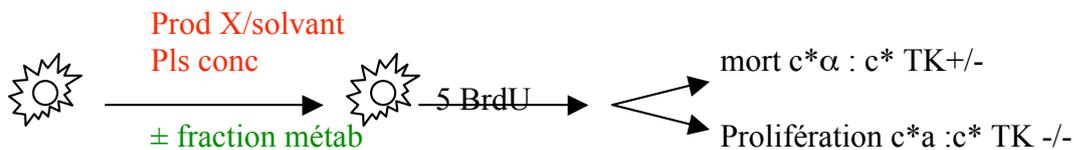
### 3.2 Test in vitro de mutations géniques et chromosomiques (macrolésions) sur cellules eucaryotes

#### MLA : Mouse Lymphoma Assay

◆ c\* eucaryotes : lymphome murin L5178 Y TK+/6 (locus thymidine kinase)

thymidine ou analogue pyrimidiques  $\xrightarrow{\text{TK}}$  Monophosphate  $\xrightarrow{\text{autres Kinases}}$  DP  $\rightarrow$  TP puis intégration ds l'ADN

◆ Protocole :



5 BrdU = 5 bromo desoxy uridine

analogue pyrimidique antimétabolite toxique

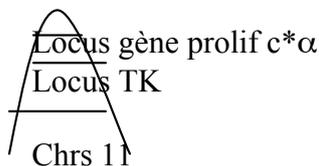
/TK  $\rightarrow$  5 BrdU MP  $\rightarrow$  intégration ds ADN  $\rightarrow$  mort c\*α

Si TK +/- n'a pas muté  $\rightarrow$  c\* capable d'intégrer 5Brdu  $\rightarrow$  mort c\*

Si prod X toxique  $\rightarrow$  mutation  $\rightarrow$  Tk -/-  $\rightarrow$  le prod ne peut plus être intégré ds l'ADN et la c\* va proliférer

$\rightarrow$  dénombre nbre de clone  $\rightarrow$  permet prévoir amplification /prod X

Locus TK / chrs 11



Les prod qui entraînent une mutation sur le locus TK  $\rightarrow$  croissance normale

Si prod casse le chr avant le gène TK  $\rightarrow$  perte gène TK + gène de prolif c\*α  $\rightarrow$  c\* se divise bcp – vite  $\Rightarrow$  petits clones

$\rightarrow$  Selon nbre et taille des colonies  $\rightarrow$  mutation génique  
mutation chrsq

(une c\* de lymphome ne possède pas de cyp450  $\rightarrow$  elle n'est pas capable d'activer)

On expose c\* à prod X  $\pm$  fraction métab  $\rightarrow$  mutagenèse  $\pm$  activation métab nécessaire

### 3.3 Test du micro nayau in vivo

◆ Souris : 5 ♀ 5 ♂ /lot

◆ Protocole : prod X :pls conc + lot témoin  
2 tps d'exposition :24 et 48H  
Euthanasie (1 trt →à 24H, 2 trt →48H)  
Puis obs sur moelle osseuse →frottis ,coloration ,microscopie optique  
Dénombrement de la lignée érythroblastes →érythroblastes  
polychromatophiles

Normalement : division c\* $\alpha$  puis expulsion du noyau vers la circulation sanguine

Qd prod X :  $\exists$  morceau de chrs cassé ds cytoplasme

→migration des chrs le long du fuseau, cytokinèse →2 c\* filles

le fragment de chrs n'est pas inclus ds noyau

Qd expulsion :le petit bout d'ADN reste ds cyto →Micronoyau

Si poison du fuseau (vinblastine, vincristine) →pls noyaux

Lecture : on prend 1000 érythrocytes polychromatophiles (c\* sans noyaux) et on détermine le % de c\* micronuclées /témoin

◆ Avantage :

Test in vivo donc pas de pb de métabolisation

Prod injecté par intrapéritonéale →métabolisation normale

◆ Inconvénients : vise moelle osseuse →nécessite vérif conc ds MO mais on vérifie slmt conc plasmatique

tout le monde possède ts des micronoyaux⇒test ut en dépistage

## Etude de la tolérance locale

- mdt à usage topique ou parentéral
  - prod cosmétique :peau ,proche de l'œil ,muqueuse buccale ...
  - prod chimiques
- phéno d'irritation (inflammation) et de corrosion (nécrose)

### I Tolérance oculaire

#### 1.1 Test d'irritation oculaire de Draize 9/6/92

- Cible : partie antérieure du globe oculaire (pas nerf ou rétine)  
→cornée ,iris, conjonctive
- Protocole : 3 lapins albinos (au lieu de 9) →visualisation sur coloration de l'iris  
produits :0.1 ml (liq) ou 100 mg (poudre) ds le cul de sac conjonctival (prod pures)  
on laisse en contact pdt 1 H  
puis examen oculaire :1 H ,1, 2, 3, 4 et 7 jours (nécrose , réversibilité ...)

examen visuel sur conjonctive, cornée, iris

- Notation :
  - Conjonctive /20  
→chemosis (infiltration oedémateuse) ,larmoiement, rougissement
  - Iris /10  
→modif couleur ,dimensions
  - Cornée /80  
→opacité :intensité et surface

- Résultat =moyenne des 3 lapins à chaque tps d'observation  
Note max (110) →indice d'irritation oculaire max = IO max

#### •Classification :

- IO max >15 →faiblement irritant
- 10 à 30 →moyennement irritant
- 30 à 50 →irritant
- IO max >50 →très irritant

- Pb d'éthique : Souffrance de l'animal (réduction à 10 mg)  
Cosmétique ?  
→Interdiction d'utiliser des animaux pour les produits finis (shampooing, mascara...)

- Produits chimiques : pas de produits à pH extrêmes  
Pas si irritant cutané (→ forcément irritant oculaire)  
Sur 1 animal d'abord (si peu irritant →3 animaux)

### II Méthodes alternatives

#### •Test du HET cam

Hen's egg test chorio allantoïc mb =mb chorio allantoïdienne de l'œuf de poule de 10 j



- 300 µl de prod à tester
- Rinçage 20 sec
- Observation ds les 5 minutes qui suivent
  - Hyperthermie
  - Hémorragie
  - Coagulation
- Tps d'apparition →Classification
- 3 œufs /conc
- Rapide, peu coûteux