

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Mouloud Mammeri TIZI OUZOU  
Faculté de médecine  
Département de pharmacie



Présenté sous forme d'article et soutenu  
publiquement en vue de l'obtention du  
diplôme de Docteur en pharmacie  
Le 07/07/2025

**Alternatives aux essais de toxicité cutanée et  
oculaire**

**Présenté par :**

ABBAS SAMAH

ADJAL HADJER

DJERROUD DAMIA

DJOUBANI HANANE

**Encadré par :**

Dr O. BELAZOUGUI

**Co-encadré par :**

Dr A. YAMANI

**Membres de jury :**

Pr L.R. MEKACHER

Professeur en Toxicologie

Président

Dr R. SEKOUANE

MAHU en Dermatologie

Examinatrice

Dr O. BELAZOUGUI

MAHU en Toxicologie

Promotrice

Dr A. YAMANI

Assistant en Toxicologie

Co-promoteur

**ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2024/2025**

**Année universitaire : 2024-2025**  
**Alternatives aux essais de toxicité cutanée et oculaire au service de**  
**toxicologie CHU/ Tizi-Ouzou**

**Alternatives to skin and eye toxicity testing**

*ABBAS SAMAH, ADJAL Hadjer, DJERROUD Damia, DJOUBANI Hanane, BELAZOUGUI Ourdia*

---

**Laboratoire de toxicologie, CHU Nedir Mohamed Tizi-Ouzou**

**Résumé :**

**Introduction :** L'utilisation croissante de produits cosmétiques expose la peau et les yeux humains à des substances chimiques irritantes, entraînant des dermatites et des conjonctivites. Le test de Draize, développé en 1944, a été la méthode de référence pour évaluer la toxicité cutanée et oculaire. Cependant, beaucoup de pays l'ont interdit en raison de la souffrance animale qu'il engendre. L'objectif de notre étude est de démontrer que le test HET-CAM, ainsi que les approches in silico, peuvent représenter des alternatives fiables et éthiques au test de Draize. **Méthodologie :** Nous avons appliqué le test de Draize à 20 échantillons cosmétiques non encore commercialisés. Sur la base des résultats obtenus, un shampooing a été sélectionné pour réaliser le test HET-CAM en observant une lyse, une hémorragie, une coagulation à des temps fixes. Enfin, une approche in silico a été effectuée. **Résultats :** Le test de Draize a permis d'évaluer l'irritation cutanée et oculaire selon les scores attribués. Le test HET-CAM a évalué l'irritation oculaire. En parallèle, les outils in silico ont prédit les paramètres toxicologiques.

**Mots-clés :** toxicité, irritation, Draize, HET-CAM, Docking, ADMET, tensioactifs.

**Abstract:**

**Introduction:** The increasing use of cosmetic products exposes human skin and eyes to irritating chemicals, leading to dermatitis and conjunctivitis. The Draize test, developed in 1944, is the reference method for assessing skin and eye toxicity. However, it has been banned due to the animal suffering it causes. The aim of our study is to demonstrate that the HET-CAM test, together with in silico approaches, can represent reliable and ethical alternatives to the Draize test. **Methodology:** We applied the Draize test to 20 cosmetic samples not yet on the market. On the basis of the results obtained, a shampoo was selected to perform the HET-CAM test, observing lysis, hemorrhage and coagulation at fixed times. Finally, an in silico approach was performed. **Results:** The Draize test assessed skin and eye irritation according to scores assigned. The HET-CAM test assessed eye irritation. In parallel, in silico tools predicted toxicological parameters.

**Keywords:** toxicity, irritation, Draize, HET-CAM, docking, ADMET, surfactants.

## **I. Introduction :**

Suite à l'augmentation significative de l'utilisation des produits cosmétiques et des soins corporels à base de composés chimiques ces dernières années, les utilisateurs sont exposés à divers risques, notamment des affections dermatologiques, des cancers, des atteintes respiratoires, des troubles neurologiques et des perturbations endocriniennes. La sécurité de ces produits doivent constituer une préoccupation majeure [1].

Afin de prévenir ces risques, une évaluation rigoureuse de ces produits s'avère indispensable, en mettant particulièrement l'accent sur le risque de toxicité cutanée et oculaire, pouvant déclencher des dermatites de contact irritatives et allergiques, des irritations oculaires, voire des conjonctivites. Une telle démarche permettrait d'assurer une protection optimale des consommateurs tout en respectant les normes de santé publique en vigueur, conformément aux exigences de la toxicologie cosmétique et des tests de sécurité [2, 3].

Les tests d'évaluation de la toxicité des produits cosmétiques avant leur mise sur le marché sont indispensables. Historiquement, cette évaluation reposait sur le test d'irritation cutanée et oculaire de lapin, connu sous le nom de test de Draize développé en 1944. Considérée comme méthode de référence et inscrite dans les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) sous les références TG 404 et TG 405. C'est une étape indispensable avant tout contact avec l'homme [1, 4, 5].

Cependant, pour des raisons de pratiques scientifiques, économiques et éthiques visant à protéger le bien-être animal, le test de Draize a été progressivement interdit par des réglementations législatives à l'échelle mondiale, notamment en union européenne depuis mars 2013 [6].

En réponse à ces préoccupations, des méthodes alternatives *in vitro*, soutenues par des organisations internationales comme l'OCDE, ont été développées, et d'autres sont en cours de développement. Ces méthodes permettent d'évaluer l'irritation cutanée et oculaire sans recourir à l'expérimentation animale, tout en garantissant des standards élevés de sécurité et d'efficacité pour les produits cosmétiques. Parmi ces alternatives figurent le test des globules rouges et la dénaturation de l'hémoglobine, le test d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (BCOP), le test de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (HET-CAM), les cornées isolées de lapins, les yeux de poules isolés, ainsi que des systèmes de cultures cellulaires. On y retrouve également le modèle de peau Epiderme, EpiSkin™, et le tes Corrositex [6].

Bien que les tests *in vitro* représentent une alternative prometteuse aux tests sur les animaux, la bio-informatique a également révolutionné la manière dont nous abordons ces défis scientifiques. En s'appuyant sur des modèles *in silico* elle ouvre de nouvelles perspectives pour l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle. Ces approches permettent de modéliser les interactions moléculaires entre des agents irritants ou sensibilisants tels que les conservateurs, les parfums ou les tensioactifs avec des protéines, des récepteurs, ainsi que les composants lipidiques qui participent à la structure cellulaire de la peau et des tissus oculaires [7].

En Algérie, la réglementation des produits cosmétiques est encadrée par quelques textes législatifs. C'est le décret exécutif n° 10-114 du 18 avril 2010 qui définit les conditions et les modalités de fabrication, de conditionnement, d'importation et de commercialisation des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle sur le marché national [8].

Actuellement, il n'existe en Algérie aucune législation spécifique interdisant ou autorisant explicitement l'expérimentation animale dans le domaine des cosmétiques. La réglementation demeure moins détaillée que dans certains autres pays.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux tests d'irritation cutanée et oculaire de produits cosmétiques issues de la production locale et ce avant leur mise sur le marché. Les produits en question ont été évalués, dans un premier temps in vivo chez le lapin à l'aide du test de Draize, c'est le test requis par la réglementation algérienne pour l'autorisation de mise sur le marché des produits cosmétiques ; Ensuite, une alternative in vitro est proposée pour l'évaluation de l'irritation oculaire à travers le test HET-CAM. Enfin pour l'irritation cutanée, une modélisation in silico des interactions entre les agents potentiellement irritants avec la kératine (cible cellulaire) ainsi qu'une prédiction de leur toxicité à l'aide des outils admetSAR ont été proposés comme alternative in silico.

In fine, nous avons comparé les résultats issus des trois approches afin d'évaluer dans quelle mesure les tests in vitro et in silico peuvent constituer une alternative fiable à l'expérimentation animale pour l'évaluation de l'irritation cutanée et oculaire.

## **II. Matériel et méthodes :**

### **II.1. Matériel :**

#### **II.1.1. L'évaluation in vivo [9] :**

- Lapins (mâles) de souche Néozélandaise (de 1,5 à 4 kg).
- 20 échantillons de produits cosmétique issus d'une production locale non encore mis sur le marché (numérotés de 1 à 20).
- Cages individuelles pour lapins en acier inoxydable.
- Tendeuse électrique.
- Source lumineuse.
- Tubes secs, micropipette, embouts.
- Lames de bistouri.
- Pansements stériles et bandes de gaze.
- Bandes de sparadrap perforées.
- Alcool et eau physiologique.
- Collerettes pour lapins.

#### **II.1.2. L'évaluation in vitro [10] :**

- Un incubateur de fabrication artisanal.
- Œufs fertiles de poules obtenus auprès de sources commerciales, frais (âgés de moins de sept jours), pesant entre 50 et 60 grammes.
- Lampe.

- Eau distillée.
- Micropipette et embouts jetables.
- Mortier et pilon.
- Chronomètre.
- Pince conique fine.
- Fiole volumétrique.
- Contrôle négatif : NaCl 0.9%
- Contrôle positif : NaOH 0.1 N

### II.1.3. L'évaluation in silico :

- Les logiciels et serveurs suivant ont été utilisés pour l'évaluation in silico sont :
  - Protein Data Bank (PDB) [11].
  - PubChem : une ressource dédiée aux substances chimiques [12].
  - CB-DOCK2 : un serveur de Docking protéine-ligand aveugle [13].
  - BIOVIA : permet la visualisation des résultats en 3D et en 2D [14].
  - Le serveur ADMET Structure-Activity Relationship (admetSAR): utilisé dans la prédiction des profils ADMET des produits chimiques, ainsi que l'évaluation de leur sécurité [15].
- Ligands et cibles :

**Tableau I** : les ligands et la cible utilisés pour le docking moléculaire

<b>Ligands (Tensio-actifs)</b>	<b>Cible</b>
Laureth sulfate de sodium (SLES); anionique(16).  -Cocamidopropyl bétaine (CAPB) ; zwitterionique (17)  -Cocamide diéthanolamine (Cocamide DEA) ; non ionique (18)	La protéine : kératine 1 et 10 (Code PDB 4ZRY) (19)

## **II.2. Méthodes :**

L'évaluation a été effectuée au niveau du laboratoire de toxicologie du département de pharmacie de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou.

### **II.2.1. L'évaluation *in vivo* (Test de Draize) :**

Le protocole est suivi selon les recommandations du test de Draize [9, 20] :

-Les lapins sont installés dans un environnement propre, dans des cages individuelles en acier inoxydable, avec un accès à la nourriture et à l'eau.

-Pour le test cutané, la veille de l'application du produit, les lapins sont tendus au niveau des deux flancs sur une surface de 14×14 cm à l'aide d'une tendeuse électrique.

-Le lendemain, seuls les lapins présentant une peau saine et glabre sont sélectionnés pour l'étude (3 lapins par produit).

-Une scarification est réalisée sur l'un des deux flancs, tandis que l'autre reste intact.

-Appliquer deux gazes imbibées du produit cosmétique à l'aide de sparadraps perforés de 10×80 cm sur les deux flancs. La zone d'application des produits est entièrement recouverte de gaze.

- Les lapins sont ensuite replacés dans leurs cages, pour des lectures à 24h, 48h, 72h.

- Pour le test oculaire une instillation unique de 0,1 ml de produit pur s'effectue dans le cul de sac conjonctival de l'un des deux yeux du lapin, les paupières sont maintenues fermées pendant 10 secondes afin d'éviter toute perte de produit. Les lapins portent des collerettes pendant une heure afin de les empêcher de se frotter l'œil.

- Les observations se font à une heure puis à un jour, à deux, trois, quatre et sept jours après l'instillation, en utilisant l'œil non instillé comme témoin.

A la fin les cotations sont établies en évaluant l'érythème et l'œdème pour l'examen cutané. Un score après 24, 48 et 72h pour chaque flanc est attribué.

Pour l'évaluation oculaire, d'autres cotations sont établies en évaluant le Chemosis, les larmolements, la rougeur de la conjonctive et les changements d'iris.

Des indices d'irritation primaire cutanée et d'irritation oculaire sont calculés.

### **Calcul de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC) :**

L'indice moyen d'irritation cutanée (I.C) est calculé en divisant la somme obtenue par le nombre total d'examen effectués (soit 12 pour 3 lapins) à chaque temps.

L'indice primaire d'irritation cutanée (I.P.C) est calculé en faisant la moyenne des I.C observés (pour 3jours).

$$\text{I.P.C} = \sum \text{I.C} / \text{N}$$

Le calcul de L'IPC nous permet de classer les substances évaluées selon l'échelle représentée dans le tableau II :

**Tableau II :** Echelle de classification de l'irritation cutanée selon l'IPC

Classe	IPC
<b>Non irritant</b>	IPC < 0,5
<b>Légèrement irritant</b>	0,5 < IPC < 2
<b>Irritant</b>	2 < IPC < 5
<b>Très irritant</b>	5 < IPC < 8

**Calcul de l'indice d'irritation oculaire :**

**Indice d'irritation oculaire individuel (I.O.I) :** correspond à la somme des scores obtenus pour chacun des 3 lapins à chaque temps d'observation.

$$\text{I.O.I} = \sum \text{RO à chaque temps}$$

$\sum \text{RO}$  : somme des scores obtenus liées aux réactions oculaires.

**Indice d'irritation oculaire moyen (I.O) :** est la moyenne des I.O.I la plus élevée (le temps d'observation correspondant étant précisé au procès-verbal).

$$\text{I.O} = \sum \text{I.O.I} / n \text{ à chaque temps}$$

n : le nombre de lapins

**Indice d'irritation oculaire maximal (I.O. Max) :** correspond à la valeur la plus élevée de l'indice d'irritation oculaire. (Le temps d'observation correspondant étant précisé au procès-verbal).

L'évaluation d'un produit se base sur l'indice d'irritation oculaire maximum (I.O Max), ainsi 4 classes permettent de catégoriser le produit cosmétique en :

**Tableau III:** Echelle de classification de l'irritation oculaire selon l'I.O. Max

Classification	I.O Max
<b>Non irritant</b>	0-5
<b>Faiblement irritant</b>	5-15
<b>Moyennement irritant</b>	15-30
<b>Irritant</b>	30-50
<b>Très irritant</b>	>50

## II.2.2. L'évaluation in vitro (HET CAM) :

A l'issue du test de Draize effectué sur les 20 produits cosmétiques, un shampoing a été sélectionné pour le HET CAM en raison des manifestations oculaires qu'il a engendrées.

-Avant toute manipulation, les œufs doivent être examinés à la lumière, ceux qui présentent des déformations, des fissures ou une coquille très fine sont immédiatement éliminés. [10]

-Pour chaque produit, 3 œufs sont utilisés (contrôle négatif, contrôle positif et la substance testée).

-Placer les œufs dans l'incubateur.

-Incuber les œufs à 38,3°.

-Tourner les œufs cinq fois par jour jusqu'au 8ème jour.

-Examiner les œufs à la lumière le 8ème jour d'incubation et éliminer les œufs non viables ou défectueux.

-Remettre les œufs dans l'incubateur sans rotation cette fois ci (la grande extrémité vers le haut pour une journée supplémentaire).

-Retirer les œufs de l'incubateur le jour 9 pour les utiliser dans le test.

-Marquer la cellule d'air de l'œuf afin de la couper, puis éliminez-la. Eviter d'endommager la membrane interne lors de la suppression de la coquille d'œuf.

-Humidifier la membrane interne avec une solution de NaCl à 0,9 % puis placer l'œuf dans l'incubateur 30 minutes maximum.

-Retirer l'œuf de l'incubateur et décanter la solution de NaCl à 0,9 %.

-Appliquer 0,3ml de shampoing et observer les réactions sur la CAM pendant une période de 300 secondes à des temps fixes.

- Le même protocole est appliqué pour le témoin positif et le témoin négatif.

Selon le protocole HET-CAM recommandé par l'ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), l'évaluation repose sur l'apparition de trois paramètres clés ; l'hémorragie, la lyse vasculaire ainsi que la coagulation. [10]

Chaque paramètre est analysé individuellement, en attribuant un score selon son temps d'apparition.

**Tableau IV:** Scores d'irritation en fonction du temps pour les effets observés dans le test

### HET-CAM

Effet	Score à 0 ,5min	Score à 2min	Score à 5min
<b>Lyse</b>	5	3	1
<b>Hémorragie</b>	7	5	3
<b>Coagulation</b>	9	7	5

Les scores attribués, sont additionnés pour obtenir une valeur numérique unique représentant le score d'irritation (IS) de la substance testée, sur une échelle de quatre catégories allant jusqu'à un maximum de 21.

Les catégories sont représentées dans le tableau ci-dessous [21].

**Tableau V : Scores d'irritation (IS) de HET -CAM**

Catégorie d'irritation	Plage de score
<b>Non irritant</b>	[0 - 0,9]
<b>Légère irritation</b>	[1 - 4,9]
<b>Irritation modérée</b>	[5 - 8,9]
<b>Irritation sévère</b>	[9 - 21]

### II.2.3. L'évaluation in silico :

A l'issue du test de Draize effectué sur le shampoing précédemment sélectionné, celui-ci a de nouveau été évalué par une approche in silico en raison des scores obtenus.

La composition de cet échantillon, fournie par le producteur est la suivante :

1. EAU DEMINERALISEE
2. LAURYL ETHER SULFATE DE SODIUM (SLES)
3. COCAMIDO-PROPYL BETAINE (CAPB)
4. COCODIETHANOLAMIDE DE COPRAH (COCAMID DEA)
5. PARFUM SUPER FRUIT
6. GUAR HYDROXYPROPYTRIMONIUM CHLORIDE
7. SODIUM CHLORIDE
8. CLIMBAZOLE
9. ACIDE CITRIQUE
10. CI 77289
11. CONSERVATEUR KHATON CG  
(METHYLCHLOROISOTHIASOETHIAZOLINONE ET  
METHYL ISOTHIAZOLINONE)

L'évaluation basée sur la littérature concernant l'effet de ces composants sur l'irritation cutanée et oculaire nous a permis de sélectionner les tensio-actifs qui seraient potentiellement responsables de cet effet et leur cible potentiel : SLES, CAPB, COCAMID DEA avec la kératine (Code PDB 4ZRY).

Le Docking moléculaire a été réalisé comme suit :

-Télécharger la protéine cible via PDB avec le code pdb 4ZRY[22].

-Télécharger les ligands via PubChem (SLES/ CAPB / Cocamide DEA)[23, 24, 25].

En raison de l'absence de site actif spécifique sur la protéine (kératine), l'interaction entre les trois ligands avec leur cible a été évaluée par un Docking moléculaire aveugle (blind Docking) réalisé à l'aide d'un outil en ligne CB-Dock2 [13].

Ce dernier assure la préparation de la protéine et des ligands à l'aide d'Open Babel et MGLTOOLS [26] :

- Ajout des atomes d'hydrogènes.
- Attribution des charges partielles.
- Eliminer les molécules d'eau de la protéine.
- Conversion en format pdbqt.
- Lancer le Docking via Auto Dock vina.

Les résultats sont visualisés grâce à BIOVIA [14].

En ce qui concerne l'étude ADMET, il suffit de coller les SMILES (les représentations linéaires des tensioactifs) dans le champ ADMET screening et de lancer la recherche [15].

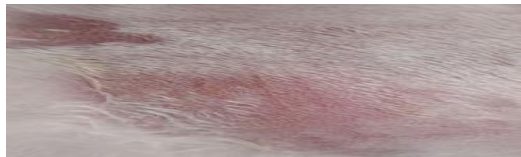
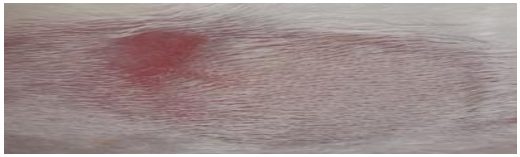
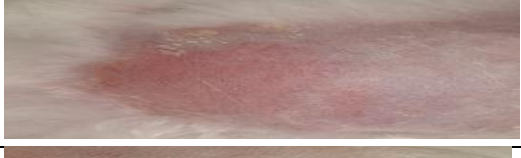



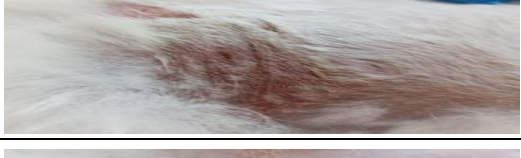

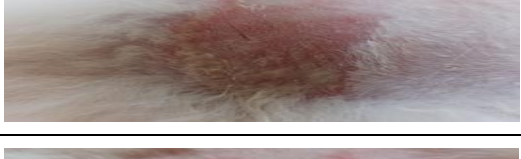
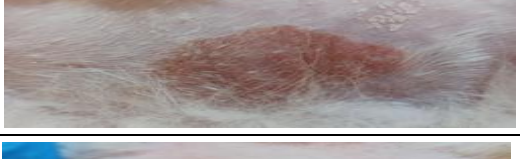






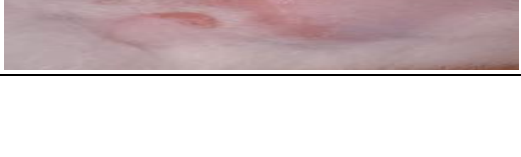

### **III. Résultats :**

#### **III.1. L'évaluation in vivo :**








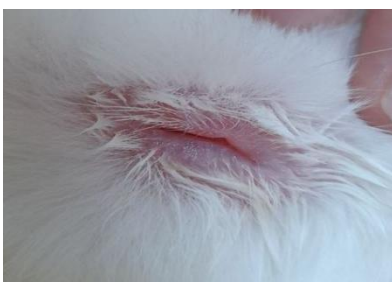


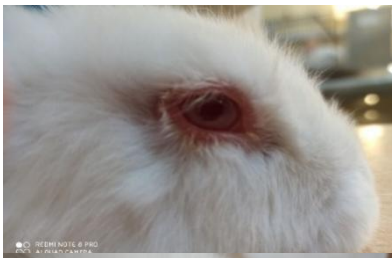




L'ensemble des 20 produits appliqués ont provoqué des irritations cutanées légères voir absentes dès le premier jour, sans apparition d'œdème. Sur le plan oculaire, quelques manifestations ont été observées entre la première et la vingt-quatrième heure.

L'échantillon numéro 07 correspondant à un shampoing vert à base de fruits a particulièrement attiré notre attention. Seuls les résultats de cet échantillon seront détaillés. L'ensemble des observations cutanées et oculaires après application de cet échantillon sur les 3 lapins sont représentées dans les tableaux VI et VII ci-dessous.

**Tableau VI:** Observations des manifestations cutanées des 3 lapins pendant 3 jours

Les jours	Les lapins	Les observations	
		Le coté scarifié (droit)	Le coté non scarifié (gauche)
24H	Lapin 1		
	Lapin 2		
	Lapin 3		
48H	Lapin 1		
	Lapin 2		
	Lapin 3		
72H	Lapin 1		
	Lapin 2		
	Lapin 3		

**Tableau VII:** Observation des manifestations oculaires des 3 lapins

Lapins Horaires	Lapin 1	Lapin 2	Lapin 3
Œil Témoin			
1H			
24H			
48H			
72H			

### **III.1.1. Test cutané :**

- À 24 h d'application du shampooing, les trois lapins présentent un érythème léger de manière identique sur le côté scarifié et le sain. Pour l'œdème, une réponse légère est observée du côté scarifié, tandis que du côté non scarifié la réaction est plus marquée particulièrement chez le lapin 2.
- À 48 heures, l'érythème reste inchangé sur les côtés scarifiés, ce qui traduit une réaction cutanée stable. En revanche, une légère variation est notée du côté non scarifié, en particulier chez le deuxième lapin, indiquant une réponse individuelle plus marquée. Concernant l'œdème, une légère diminution des scores est observée par rapport à 24 heures, indiquant une atténuation de la réaction inflammatoire. Toutefois chez le premier lapin, la progression de l'œdème du côté non scarifié suggère une réponse différée.
- À 72 heures, la majorité des lapins présente un érythème légèrement persistant. En ce qui concerne l'œdème, les scores sont nuls dans presque tous les cas, à l'exception du lapin 2 du côté non scarifié,
- L'ensemble des données met en évidence une réaction cutanée modérée, cette irritation demeure stable jusqu'à 72 heures.
- L'œdème observé est plus marqué sur les côtés non scarifiés chez certains lapins (le 2ème à 24 h et le premier à 48 h),
- Toutefois, une diminution progressive de l'œdème est constatée, menant à une quasi disparition à 72 heures.
- Selon la moyenne obtenue, l'indice de pouvoir irritant de 0.8 est inclus dans l'intervalle [0,5 – 2], permet de classer le produit cosmétique comme légèrement irritant.

### **III.1.2. Test oculaire :**

- Les scores oculaires sont attribués selon le protocole et par comparaison avec l'œil témoin de chaque lapin. Les scores sont représentés dans les tableaux IX, X, XI.
- Le lapin 1 présente une irritation oculaire légère à modérée lors de la première heure décrite par un œdème et une rougeur conjonctivale, qui diminue rapidement à 24 heures et disparaît totalement le deuxième jour.
- Le 2ème présente la réaction la plus prononcée dès la première heure, avec une aggravation notable du Chemosis à 24 heures, suivie d'une diminution voire une disparition totale le deuxième jour.
- Le lapin 3 n'a marqué aucune réaction.

- Suite au calcul de l'ensemble des I.O.I et des I.O pour les trois lapins à des temps fixes.

L'I.O. Max est I.O la plus élevée :

I.O.MAX = 2,33
----------------

- L'indice d'irritation oculaire maximal obtenu de 2.33 est inclus dans l'intervalle [0-5], ainsi le produit cosmétique est classé comme **non irritant**.

**Tableau VIII:** Scores des manifestations cutanées des 3 lapins

	Lapin	Erythème et escarres		Œdème		IC	Moyenne
		Côté scarifié	Côté non scarifié	Côté scarifié	Côté non scarifié		
24H	1	1	1	1	1	0,1	0,80
	2	1	1	1	2		
	3	1	1	0	1		
48H	1	1	0	1	2	0,91	
	2	1	2	0	1		
	3	1	1	0	1		
72H	1	1	0	0	0	0,5	
	2	1	1	0	1		
	3	1	1	0	0		

**Tableau IX:** Scores des manifestations oculaires du lapin 1

	Conjonctive			Cornée		Iris	I.O.I
	Chemosis	Larmolement	Rougeur de conjonctive palpébrale	Degré d'opacité	Surface d'opacité	Congestion et réaction à la lumière	
<b>1H</b>	1	1	1	/	/	0	3
<b>J1</b>	0	1	0	/	/	0	1
<b>J2</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J3</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J4</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J7</b>	0	0	0	/	/	0	0

**Tableau X :** Scores des manifestations oculaires du lapin 2

	Conjonctive			Cornée		Iris	I.O.I
	Chemosis	Larmolement	Rougeur de conjonctive palpébrale	Degré d'opacité	Surface d'opacité	Congestion et réaction à la lumière	
<b>1H</b>	1	1	2	/	/	0	4
<b>J 1</b>	4	1	1	/	/	0	6
<b>J 2</b>	1	0	0	/	/	0	1
<b>J 3</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J 4</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J 7</b>	0	0	0	/	/	0	0







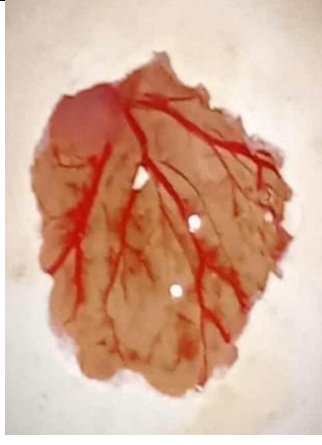


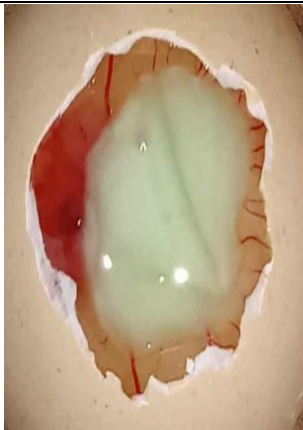
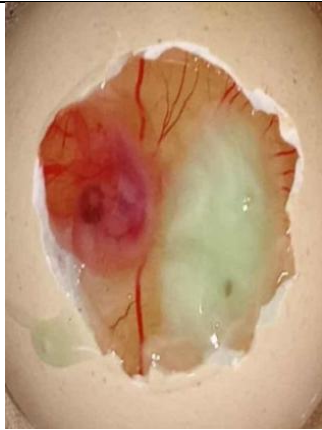

**Tableau XI :** Scores des manifestations oculaires du lapin 3

	Conjonctive			Cornée		Iris	I.O.I
	Chemosis	Larmolement	Rougeur de conjonctive palpébrale	Degré d'opacité	Surface d'opacité	Congestion et réaction à la lumière	
<b>1H</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J 1</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J 2</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J 3</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J 4</b>	0	0	0	/	/	0	0
<b>J 7</b>	0	0	0	/	/	0	0

### III.2. L'évaluation in vitro :

Le tableau XII, représente les manifestations de la CAM liées au premier contact avec notre produit ainsi que les deux témoins (NaOH/NaCl).

**Tableau XII:** Observations des œufs à des intervalles de temps fixes.

	Avant	0,5min	2min	5min
Témoin (-) : NaCl				
Témoin (+) : NaOH				
Substance d'essai				

**Tableau XIII** : Résultats des trois phénomènes observés à chaque temps fixe.

	0,5min	2min	5min	Score totale
Témoin (-) : NaCl	Aucun phénomène	Aucun phénomène	Aucun phénomène	00
Témoin (+) : NaOH	Hémorragie (Score partiel : 07)	Lyse vasculaire (Score partiel : 05)	Coagulation intravasculaire (Score partiel : 03)	15
Substance d'essai	Aucun phénomène	Aucun phénomène	Lyse et Hémorragie (Score partiel : 01et 03)	04

Le NaCl utilisé comme témoin négatif a obtenu un score nul. Le NaOH autant que témoin positif a présenté un score élevé de 15, validant ainsi la fiabilité de la technique.

La substance testée quant à elle, a affiché un score de 4, ce qui la situe dans l'intervalle [1-4,9] et permet de la classer comme légèrement irritante.

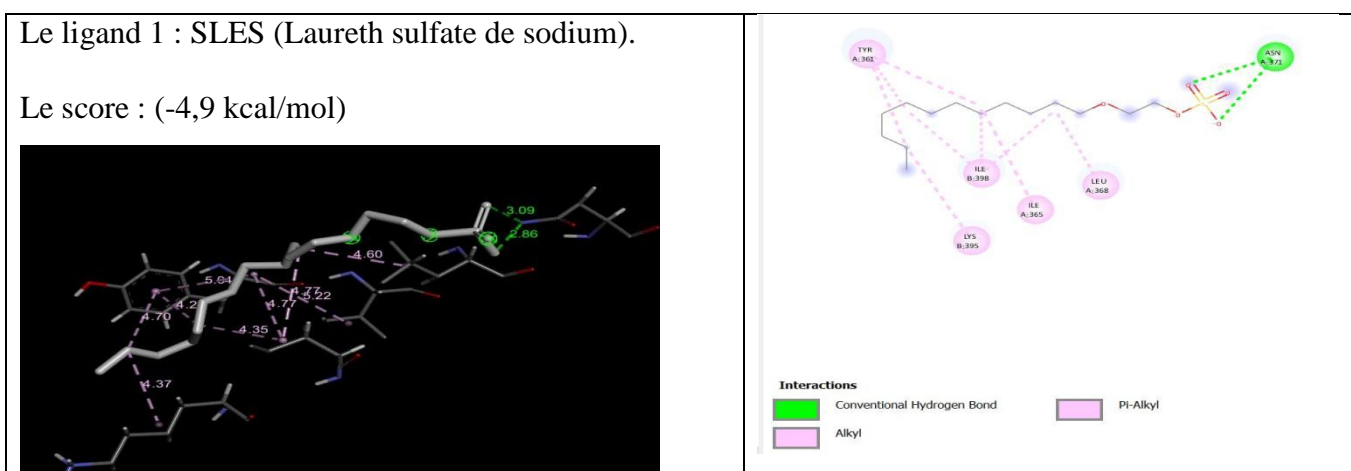
### III.3. L'évaluation in silico :

L'étude in silico est subdivisée en deux parties ; la première comprend les amarrages moléculaires et la seconde, les profils ADMET de chaque tensioactif.

#### III.3.1. Docking moléculaire :

Le tableau XIV représente les résultats de l'amarrage moléculaire entre la kératine et les 3 tensio-actifs contenus dans le shampooing.

**Tableau XIV** : Résultats des amarrages moléculaires effectués entre la kératine et les tensioactifs





### III.3.2. ADMET :

Les résultats ADMET obtenus sont représenté dans le tableau XVI :

**Tableau XVI :** Profil toxicologique comparatif des 3 tensioactifs.

	SLES	CAPB	Cocamide DEA
Corrosion oculaire	0(47.7%)	0 (42.3%)	0 (21.2%)
Irritation oculaire	1(89.3%)	1 (82.8%)	1 (87.7%)
Corrosion cutanée	0(34.2%)	0 (47.4%)	0 (2.6%)
Irritation cutanée	0(44.1%)	1(68.99%)	0 (33.1%)
Sensibilisation cutanée	0(31.6%)	0 (37.9%)	0 (39.7%)
Toxicité cutanée aigüe	1(64.1%)	1(88.2%)	0 (18.3%)
Toxicité photoinduite	1(56.2%)	1 (63%)	0 (40.2%)
Phototoxicité	0(16.8%)	0 (26.7%)	0 (16.9%)
Photo allergie	1(56.1%)	1 (54.8%)	0 (28.8%)

Pour l'irritation oculaire, les 3 tensioactifs ont obtenu des scores élevés. En ce qui concerne l'irritation cutanée le SLES et le Cocamide DEA ont obtenu des scores inférieurs à la moyenne contrairement au CAPB.

Les 3 tensio-actifs sont alors classés en fonction de la sévérité des irritations (Tableau XVI I et XV III).

**Tableau XVII:** Classification des tensioactifs en fonction de la sévérité des irritations.

Catégorie d'irritation	Plage de score (%)
<b>Non irritant</b>	[0 - 20]
<b>Légère irritation</b>	[20 - 50]
<b>Irritation modérée</b>	[50 - 80]
<b>Irritation sévère</b>	> 80 %

**Tableau XVII I : Interprétation des scores ADMET en fonction de la sévérité des irritations.**

<b>L'évaluation</b>	<b>Les ligands</b>	<b>Classification</b>
<b>-Cutanée</b>	SLES	Irritant léger
<b>-Oculaire</b>	SLES	Irritant sévère
<b>-Cutanée</b>	CAPB	Irritant modéré
<b>-Oculaire</b>	CAPB	Irritant sévère
<b>-Cutanée</b>	Cocamide DEA	Irritant léger
<b>-Oculaire</b>	Cocamide DEA	Irritant sévère

#### **IV. Discussion :**

##### **IV.1. L'évaluation in vivo :**

###### **IV.1.1. Contraintes :**

L'agitation des lapins a rendu difficile l'étape de rasage et d'application du produit sur les deux flancs.

Le maintien du produit en contact avec la peau pendant 24 heures constitue une autre difficulté due à l'agitation des lapins.

La repousse rapide des poils chez les lapins représente un facteur défavorable pour les observations, bien que des érythèmes et des œdèmes soient présents, la densité des poils recouvrant la zone d'application masque les lésions, ce qui peut fausser l'évaluation.

Une contrainte significative réside dans l'absence de lampe UV, indispensable pour identifier les lapins sains en révélant la présence ou l'absence de lésions superficielles sur la cornée qui sont invisibles à l'œil nu (après l'application de fluorescéine en collyre).

De même, l'absence d'ophtalmoscope représente un autre manque pour l'observation des éventuels dommages internes causés par ces produits cosmétiques.

Cependant, nous avons réussi à évaluer le niveau d'irritation cutanée et oculaire des produits et à établir une classification basée sur les indices calculés selon les protocoles appliqués.

###### **IV.1.2. Interprétation des résultats :**

Le shampoing étant appliqué pour la première fois sur les lapins, l'ensemble des réactions cutanées et oculaires observées suggère que la dermatite irritative déclenchée est due à l'existence des composants irritants dans le produit cosmétique [27].

Il a été observé une réaction plus marquée sur le côté non scarifié par rapport au flanc scarifié ce qui peut être considéré comme paradoxale, cependant ceci peut être expliqué par la formation d'une fine croûte après scarification pouvant empêcher la pénétration totale des tensio-actifs. Globalement, les résultats révèlent une légère toxicité cutanée qui nécessite une évaluation plus approfondie, notamment en vue d'un usage à long terme chez l'humain.

Selon les résultats obtenus, le produit cosmétique testé peut être envisagé pour une commercialisation, conformément au protocole du test de Draize. Ce dernier constitue une méthode d'évaluation rigoureuse, qui nous a permis d'observer de manière détaillée les réactions biologiques sur un organisme vivant, depuis l'apparition des premières manifestations jusqu'à leur résolution.

Toutefois cette procédure bien qu'efficace du point de vue scientifique, soulève plusieurs limites. D'une part, la durée nécessaire à l'observation complète des effets implique une exposition prolongée de l'animal à une potentielle douleur, en particulier lors des scarifications, de l'application des produits et des évaluations répétées, et ce, sans recours à des analgésiques, ce qui aggrave la souffrance animale [6].

Au-delà de l'aspect éthique, le test de Draize est également critiqué pour la subjectivité de l'évaluation, ainsi que pour la faible transposabilité des résultats obtenus sur le lapin à l'être humain. En effet la peau du lapin caractérisée par un épiderme plus mince, réagit plus fortement aux agents irritants. De même, des différences anatomiques et physiologiques importantes entre l'œil du lapin et celui de l'humain limitent la pertinence de l'extrapolation des données : la cornée du lapin est plus fine, sa production lacrymale et la fréquence de clignement sont réduites, et la sensibilité de la surface oculaire est moindre. De plus, la présence de sacs conjonctivaux plus volumineux et d'une membrane nictitante (ou troisième paupière) facilite l'élimination des substances testées, ce qui fausse l'interprétation des effets observés comparés à l'œil humain [6, 28, 29, 30, 31, 32].

Ainsi, malgré son utilité historique, le test de Draize reste controversé et met en lumière la nécessité de recourir à des méthodes alternatives plus éthiques, fiables et prédictives pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques [29].

## **IV.2. L'évaluation in vitro :**

### **IV.2.1. Contraintes :**

L'ouverture de la coquille et le retrait de la membrane interne peuvent entraîner une lyse mécanique de la membrane chorioallantoïque. D'autre part, la couleur verte du produit testé a rendu l'observation des modifications sur la membrane difficile.

### **IV.2.1. Interprétation des résultats :**

Le témoin positif (NaOH) a provoqué l'apparition d'une hémorragie intense au bout de 30 secondes, due à des dommages vasculaires, suivie de la disparition des vaisseaux sanguins à 2 minutes, indiquant une lyse, puis d'une coagulation intravasculaire observée à 5 minutes, correspondant à la formation de caillots. Ces trois phénomènes constituent des réactions typiques observées lors de l'application d'un irritant sur la CAM [33, 34].

Lorsque le NaOH est appliqué sur la membrane chorioallantoïque, les ions hydroxyde, fortement alcalins, augmentent le pH de l'environnement cellulaire. Cette élévation du pH perturbe l'homéostasie cellulaire et entraîne des dommages aux cellules de la membrane en provoquant un déséquilibre acido-basique. Les ions hydroxyde peuvent également interagir avec les lipides des membranes cellulaires, altérant leur structure et leur fonctionnement [33, 34].

Ces interactions entre l'ion hydroxyde et la membrane chorioallantoïque entraînent une lyse, une hémorragie et une coagulation, confirmant ainsi les propriétés irritantes bien documentées du NaOH dans la littérature, ainsi que la sensibilité du test HET-CAM à détecter les substances irritantes et corrosives [33, 34].

Le témoin négatif est un sérum physiologique à 0,9% qui a donné un score de 0. Son osmolarité similaire à celle du plasma humain, explique l'absence des trois phénomènes étudiés, validant ainsi l'échantillon [34].

La comparaison avec les scores des témoins positif et négatif renforce la validité et la fiabilité de notre étude.

La lyse et l'hémorragie induites par la substance testée s'explique par la destruction vasculaire (principalement les fines veinules) tandis que les gros vaisseaux conservent leur intégrité initiale. Par ailleurs, l'hémorragie reste de faible intensité et évolue lentement comparée à celle observée chez le témoin positif. Ces observations justifient l'attribution d'un score de 4 au shampoing.

Selon le protocole de l'ICCVAM : le résultat  $4 < 9$  indique que la substance d'essai est non sévèrement irritante. Plus exactement une valeur comprise dans l'intervalle  $[0,1 - 4,9]$  permet de classer le produit comme légèrement irritant [10, 21, 35].

Le test HET-Cam a permis donc d'évaluer les effets de la substance testée sur la conjonctive, en s'appuyant sur la richesse vasculaire de la membrane chorioallantoïque, qui présente une analogie fonctionnelle avec les tissus vasculaires et muqueux de l'œil humain [21].

Cependant, cette méthode reste partielle, car elle n'examine ni la structure de la cornée, ni l'iris, ni la production lacrymale ; éléments essentiels dans l'évaluation complète de la toxicité

oculaire. De plus, l'interprétation des résultats repose sur une appréciation visuelle subjective, et ne permet pas d'évaluer la réversibilité des lésions induites [21, 32].

### **IV.3. L'évaluation in silico:**

#### **VI.3.1. Docking moléculaire :**

Les scores du Docking obtenus pour les trois tensioactifs SLES, CAPB et Cocamide DEA sont respectivement -4,9 / -5,0 et -4,6 kcal/mol indiquant l'existence d'interactions entre chacun de ces ligands avec la kératine 1-10 épidermique. Ces interactions se traduisent par la formation des liaisons hydrogènes et hydrophobes de faibles distances.

En l'absence d'un ligand co-cristallisé, le calcul du RMSD pour valider le Docking moléculaire n'a pas pu être fait.

En se basant sur le principe, plus le score est négatif, plus l'interaction est forte et stable, on remarque que les trois tensioactifs présentent une affinité modérée [36].

Ces résultats confirment les données de la littérature, selon lesquelles les tensioactifs, en raison de leur propriété physico-chimiques, sont parmi les principales substances impliquées dans l'irritation cutanée en interagissant notamment avec les protéines de l'épiderme, entraînant leur dénaturation [37, 38].

Ce type d'interaction peut provoquer une altération de la structure tertiaire de la kératine ainsi que la perte de sa conformation secondaire en hélice  $\alpha$ . Cela expose de nouveaux sites hydrophiles et favorise l'adsorption d'eau, entraînant un gonflement de la couche cornée. Cette altération compromet l'intégrité de la barrière épidermique et facilite la pénétration des tensioactifs vers les couches plus profondes de la peau [39].

Les interactions des tensioactifs avec les kératinocytes induit alors la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , déclenchant une cascade inflammatoire : vasodilatation, recrutement de cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T et B, etc.). Cliniquement, cela se manifeste par des rougeurs, des érythèmes, des desquamations et des démangeaisons, ce qui corrobore les observations in vivo effectuées sur les lapins [39, 40].

Le potentiel irritant des tensioactifs dépend principalement de leur structure amphiphile et de leurs propriétés physico-chimiques : les tensioactifs ioniques sont plus irritants que les zwitterioniques, qui eux-mêmes sont plus irritants que les non ioniques. Les têtes hydrophiles ioniques se lient fortement aux protéines via des liaisons électrostatiques, tandis que les têtes hydrophiles non ioniques interagissent plus faiblement par liaisons hydrogènes et forces de Van der Waals, d'où leur faible potentiel irritant. Ces interactions sont en outre renforcées par l'insertion des queues hydrophobes dans les sites non polaires des protéines [38, 39].

Le manque de données précises sur les concentrations utilisées dans notre étude constitue une limite, empêchant une interprétation plus complète de l'effet des tensioactifs sur la base de leur état d'agrégation. En effet la concentration des tensioactifs joue un rôle clé dans leur effet irritant. À des concentrations inférieures à la concentration micellaire critique (CMC), les molécules existent principalement sous forme de monomères, capables de pénétrer facilement la peau et d'induire une irritation. Une fois la CMC atteinte, des micelles moins irritantes se forment. En revanche, lorsque la CMC est largement dépassée, un excès de monomères libres et la formation de micelles de petites tailles peuvent aggraver l'irritation cutanée [19, 38, 39].

Le Docking moléculaire est une technique rapide et n'utilise pas les animaux mais elle ne prend pas en compte des paramètres essentiels tels que le type de tensioactif, la durée d'exposition, la perméabilité cutanée, la concentration locale, ou encore l'impact sur la structure lipidique de l'épiderme [29, 41].

De plus, des facteurs comme la taille, la flexibilité et la polarité des molécules peuvent réduire la précision des résultats obtenus [42].

Enfin, cette méthode offre une vision statique de l'interaction ligand-protéine, sans refléter la complexité, on peut donc considérer que l'amarrage moléculaire constitue une approche qualitative plutôt que quantitative.

#### **IV.3.2. ADMET :**

Une analyse ADMET est réalisée afin de prédire le degré de toxicité oculaire et cutanée des trois tensioactifs.

Bien que les résultats du Docking moléculaire montrent une affinité similaire entre les trois tensioactifs et la kératine épidermique, l'analyse ADMET prévoit un potentiel irritant cutané plus susceptible pour le CAPB.

Cette divergence s'explique par le fait que les outils ADMET reposent sur des modèles QSAR et des algorithmes statistiques fondés sur de vastes bases de données expérimentales. Toutefois, même ces approches ne tiennent pas compte de facteurs essentiels tels que la concentration réelle des substances, ou les interactions potentielles entre différents composants [43].

Le SLES connu pour son potentiel irritant dans la littérature, a été sous-estimé par les modèles prédictifs ADMET.

#### **IV.4. Comparaison des 3 approches :**

Malgré ses limites, le test de Draize est le seul à pouvoir évaluer simultanément l'irritation cutanée et oculaire, le HET-CAM s'intéresse uniquement à l'irritation oculaire en se limitant à l'évaluation de la conjonctive.

Néanmoins, en l'absence d'ophtalmoscope et de lampe UV, il est préférable de compléter le test de Draize avec le test de HET-CAM.

Quant aux outils *in silico*, ils n'ont pas directement évalué les irritations, mais ont permis de comprendre le type d'interaction mis en cause dans l'irritation cutanée des tensio-actifs grâce à l'amarrage moléculaire. Aussi, une classification du pouvoir irritant des produits est impossible avec cet outil contrairement au test de Draize et HET CAM.

L'étude ADMET quant à elle, permet d'orienter le fabricant de cosmétologie dans le choix initiale des composants qu'il utilise. Dans notre cas, il aurait été évident pour lui que l'utilisation simultanée de 3 tensio-actifs connu pour un éventuel pouvoir irritant aurait été défavorable.

Les outils *in silico* doivent donc être réalisés en amont de toute synthèse du produit, ce qui permet de gagner du temps et d'éviter de pertes financières en cas de résultats négatifs [29].

Sur le plan éthique, le test de Draize n'est pas conforme aux principes du bien-être animal. En revanche le test HET-CAM est considéré éthiquement acceptable tant que l'embryon utilisé n'a pas dépassé 9 jours d'incubation, stade auquel le système nerveux n'est pas encore développé. Par ailleurs, les méthodes *in silico* n'ont eu aucun recours à l'expérimentation animale.

D'un point de vue économique, le test de Draize s'avère être le plus onéreux, suivi du test de HET-CAM. Les outils *in silico* ont l'avantage de ne pas requérir de matériel sophistiqué.

En ce qui concerne la rapidité, le test de Draize est le moins performant ; il dure minimum 7 jours. En ce qui concerne le test de HET-CAM, l'incubation des œufs prend un temps presque similaire, mais les résultats sont obtenus immédiatement, tout comme avec les outils *in silico*.

Enfin la subjectivité et la variabilité inter et intra laboratoires, sont rencontrés uniquement avec le test de Draize et HET-CAM.

## **V. Conclusion :**

L'évaluation de l'irritation cutanée et oculaire constitue un paramètre toxicologique majeur pour garantir la sécurité des produits cosmétiques chez l'homme. Le test in vivo de Draize demeure la méthode de référence pour cette analyse. Toutefois, le modèle HET-CAM, conforme aux principes éthiques des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), représente une alternative fiable et facile à mettre en œuvre pour détecter le potentiel irritant au niveau oculaire. Ce modèle se limite cependant à l'étude des réactions conjonctivales, et nécessite d'être complété par d'autres approches pour espérer remplacer entièrement le test de Draize.

Par ailleurs, le Docking moléculaire constitue une technique innovante et rapide, permettant de prédire des affinités de liaison spécifiques. Néanmoins, cette approche demeure qualitative et ne prend pas en compte l'ensemble des composants d'un produit simultanément.

En l'état actuel, ces méthodes alternatives nécessitent encore des améliorations avant de pouvoir substituer complètement le test de Draize. En Algérie ce dernier demeure toujours indispensable pour l'évaluation de la toxicité des produits cosmétiques.

# Bibliographies

1. Abdullah, M Alnuqaydan. The dark side of beauty: an in-depth analysis of the health hazards and toxicological impact of synthetic cosmetics and personal care products.
2. Amasa W, Santiago D, Mekonen S, Ambelu A. Are cosmetics used in developing countries safe? Use and dermal irritation of body care products in jimma town, southwestern ethiopia. *J Toxicol*. 2012.
3. Liu Y, Liu Y, Zhang S, Zeng C, Zhang Q, Jiang Y, et al. Using explainable machine learning to predict the irritation and corrosivity of chemicals on eyes and skin. *Toxicology Letters*. 15 Mai 2025.
4. Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion | OECD.
5. OCDE. Essai n° 405 : Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.
6. Lee M, Hwang JH, Lim KM. Alternatives to In Vivo Draize Rabbit Eye and Skin Irritation Tests with a Focus on 3D Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium and Epidermis Models. *Toxicol Res*. Juill 2017.
7. Madden JC, Enoch SJ, Paini A, Cronin MTD. A Review of In Silico Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Altern Lab Anim*. Juill 2020
8. Décret exécutif n° 10-114 du 18 avril 2010 modifiant et complétant le décret exécutif n° 97-37 du 14 janvier 1997 définissant les conditions et les modalités de fabrication, de conditionnement, d'importation et de commercialisation, sur le marché national, des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle
9. Dominique Pradeau. Analyse pratique du médicament. Cachan : Editions médicales internationales, 1992
10. Ivocular-hetcam.pdf.
11. RCSB PDB: Homepage. Disponible à: <https://www.rcsb.org/>
12. PubChem. Disponible à: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
13. CB-Dock2: An accurate protein-ligand blind docking tool. Disponible à: <https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/index.php>
14. BIOVIA Discovery Studio | Dassault Systèmes. Disponible à: <https://www.3ds.com/fr/products/biovia/discovery->
15. admetSAR 3.0: prédiction. Disponible à: [https://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar3/predict\\_result.php](https://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar3/predict_result.php).
16. V Charbonnier et al. Subclinical, non-erythematous irritation with an open assay model (washing): sodium lauryl sulfate (SLS) versus sodium laureth sulfate (SLES).
17. C S, P W, Ž B, S H, Ms H, Jd J, et al. Skin Toxicity of Selected Hair Cosmetic Ingredients: A Review Focusing on Hairdressers. *International journal of environmental research and public health*.

18. PANICO A, SERIO F, BAGORDO F, GRASSI T, IDOLO A, DE GIORGI M, et al. Skin safety and health prevention: an overview of chemicals in cosmetic products. *J Prev Med Hyg.* 29 mars 2019.
19. Ronni Wolf et al. Effect of soaps and detergents on epidermal barrier function.
20. Arrêté du 5 avril 1971 relatif aux méthodes officielles d'analyse des cosmétiques et produits de beauté.
21. Mohamed Tahar, Taha Derouiche et al. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries.
22. RCSB PDB - 4ZRY: Crystal structure of the heterocomplex between coil 2B domains of human intermediate filament proteins keratin 1 (KRT1) and keratin 10 (KRT10). Disponible à: <https://www.rcsb.org/structure/4ZRY>.
23. PubChem. Sodium Lauryl éthoxysulfate. Disponible à: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23665884>.
24. PubChem. Lauramidopropyl betaine. Disponible à: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/20280>.
25. PubChem. N, N-Bis (2-hydroxyethyl) dodecanamide. Disponible à: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8430>.
26. Yang Liu, Xiaolongbao Yang, Jianzhong Gan, Shuang Chen, Zhi-Xiong Xiao, Yang Cao Author Notes. CB-Dock2: improved protein–ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic.
27. Collet E, Jeudy G, Dalac S. Dermatitis de contact aux produits d'hygiène. *Revue Française d'Allergologie*.
28. Hamdy Abdelkader, Barbara Pierscionek, Mark Carew, Zimei Wu, Raid G Alany. Critical appraisal of alternative irritation models: three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals. Mars 2015.
29. Samantha L Wilson, Mark Ahearne, Andrew Hopkinson. An overview of current techniques for ocular toxicity testing.
30. Chanyang Uhm, Haengdueng Jeong, Su Hyon Lee, Jae Sung Hwang, Kyung-Min Lim, Ki Taek Nam. Comparison of structural characteristics and molecular markers of rabbit skin, pig skin, and reconstructed human epidermis for an ex vivo human skin model.
31. J B, U P, E A, N A, MC, A DS, et al. Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). Févr 2017.
32. Vinardell MP, Mitjans M. Alternative Methods for Eye and Skin Irritation Tests: An Overview. *JPharmSci.* 1 Janv 2008.
33. Hydroxide-de-sodium.pdf. PRISE EN CHARGE DES PROJECTIONS CHIMIQUES OCULAIRES ET CUTANÉES.

34. Étude de la toxicité locale in vitro : Het-Cam Test.
35. Barile FA. Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010.
36. Jantarawong S, Swangphon P, Lauterbach N, Panichayupakaranant P, Pengjam Y. Modified Curcuminoid-Rich Extract Liposomal CRE-SD Inhibits Osteoclastogenesis via the Canonical NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Pharmaceutics*. 30 août 2023.
37. G. ÖZDEMİR, Ö.E. Sergin. Keratin–rhamnolipids and keratin–sodium dodecyl sulfate interactions at the air/water interface.
38. Artur Seweryn. Interactions between surfactants and the skin – Theory and practice. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1 juin 2018.
39. Lemery E. Structure et physicochimie des tensioactifs, leurs impacts sur la toxicité cutanée et la fonction barrière. 2015.
40. Kumar S, Saha D, Ray D, Aswal VK. Surfactant-driven modifications in protein structure. *Soft Matter*. 25 juin 2025.
41. Ac S, Jvnb B, Vm A, Sus H, N F, N K, et al. Novel computational models offer alternatives to animal testing for assessing eye irritation and corrosion potential of chemicals. *Artificial intelligence in the life sciences*. Déc 2021.
42. Liu Y, Grimm M, Dai WT, Hou MC, Xiao ZX, and Cao Y. CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking. *Acta Pharmacol Sin*. Janv 2020.
43. Fu L, Shi S, Yi J, Wang N, He Y, Wu Z, et al. ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. *Nucleic Acids Res*.