

# Introduction du test sur Membrane Chorioallontoïque de l'œuf de poule pour les produits cosmétiques dans un contexte malgache

## Introduction of the Chicken Egg Chorioallontoic Membrane Test for Cosmetic Products in a Madagascan Context

Eugénie Josephine<sup>1</sup>, Helga Rim Farasoa<sup>1</sup>, Rabarisoa Herilalaina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie et de Valorisation des Produits Naturels, Antananarivo, Madagascar, rim.farasoa.helga@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratoire HOMEOPHARMA, Sambaina, Antananarivo 106, Madagascar, homeochimie@homeopharma.mg

**RÉSUMÉ.** Les produits naturels de soin et de bien être intéressent de plus en plus les consommateurs, entre 2015 et 2019 par exemple, la croissance mondiale enregistrée pour cette part de marché a été de 10 à 11% [FER 21]. Cette situation offre une opportunité favorable pour l'émergence des pays en développement. Cependant, pour pouvoir proposer des produits sur le marché international, ces pays doivent se conformer aux règlements et aux normes imposés par les échanges internationaux. Parmi ces règlements, la législation Européenne a banni les tests sur les modèles animaux pour les cosmétiques [JOU 09]. L'embryon de l'œuf de poule n'est pas considéré comme un animal [RIB 16]. Dans un pays où la disponibilité des moyens financiers et matériels est très limitée, le test sur membrane chorioallontoïque de l'œuf de poule offre une méthode non coûteuse et facile à mettre en œuvre pour des tests cosmétiques. Après une étude préalable des conditions optimales, le dispositif de couvaison naturelle s'avère être le plus adapté dans le contexte malgache. Des produits cosmétiques fournis par des laboratoires locaux ont été testé. Malgré le fait que la validation de cette méthode est déjà acquise au niveau de plusieurs pays, une comparaison avec des essais sur oreille de lapin a été effectuée [BUD 21]. La bonne adaptabilité et la souplesse de cette technique ont été démontrées. Il s'agit ici d'un transfert de technologie facile et bénéfique pour le contexte socio-économique malgache.

**ABSTRACT.** Natural skin-care and wellness products are of increasing interest to consumers. For example, between 2015 and 2019, the global growth recorded for this market was up 10 to 11% [FER 21]. This situation offers a favourable opportunity for developing countries. However, in order to be able to offer products on the international market, these countries must comply with the regulations and standards imposed by international trade. Among these regulations, European legislation has banned animal model testing for cosmetics. [JOU 09]. Since a hen's egg embryo is not considered an animal in most countries before 17 days of incubation, the use of the chorioallontoic membrane HET CAM test is a proposed alternative method. Furthermore, before 14 days, most agree that the embryo does not yet experience pain [RIB 16]. In a Madagascan context, where material and financial means are limited, the HET CAM method is an inexpensive and easy-to-perform procedure for testing cosmetics. After an evaluation of the possible appropriate techniques, natural brooding was chosen as the most suitable system for Madagascar. Some locally produced cosmetic creams were tested. Although HET CAM is widely recognized in many countries as a valid method for testing irritant products, tests on rabbits' ears were performed for comparison purposes [BUD 21]. The good adaptability and flexibility of this technique has been demonstrated. In the Madagascan socio-economic context, this is an easy and beneficial technology transfer.

**MOTS-CLÉS.** Transfert de technologie, tests cosmétiques alternatifs, HET CAM, irritation, hypérémie.

**KEYWORDS.** Technology transfer, Alternative cosmetic tests, HET CAM, Irritation, Hyperaemia.

### 1. Introduction

L'île de Madagascar est connue pour sa richesse unique en biodiversité [PAT 19]. Cette richesse pourrait être gérée d'une manière rationnelle pour contribuer au développement du pays. Les ressources naturelles présentent un vaste domaine d'application touchant tous les niveaux socio-économiques, du nutritionnel, à la cosmétique, en passant par la pharmaceutique [LAM 21]. Parallèlement au développement des activités, il faudrait introduire les moyens technologiques qui

les accompagnent. Dans le cadre du développement des activités de production de cosmétique à Madagascar, l'introduction de moyens sûrs pour tester les produits s'impose. Il est primordial d'assurer la sécurité des consommateurs par rapport à l'innocuité des produits mis sur le marché. Parmi les tests alternatifs à l'utilisation du modèle animal en cosmétique, le test sur membrane chorioallontoïque de l'œuf de poule (HET-CAM) est une méthode peu coûteuse [VIN 17]. Il s'agit de l'une des plus vieilles alternatives du test de Draize sur l'irritation, et il ne nécessite pas de technologie compliquée, pouvant s'adapter facilement dans le contexte des pays en développement. Il a été déjà introduit en Algérie avec succès [DER 17]. Le contexte malgache est très particulier parce que même les coupures fréquentes d'électricité au laboratoire ne permettent pas le fonctionnement correct d'un incubateur d'œufs. L'objectif de cette recherche est de trouver le moyen le plus approprié pour transférer cette technologie dans un contexte malgache.

## 2. Contexte de l'introduction du test HET-CAM à Madagascar

Dans le cadre de la mondialisation, les pays en développement doivent suivre obligatoirement la course à l'innovation. Avec l'évolution rapide de la technologie, les produits lancés sur le marché ont souvent une courte durée de vie [AUD 14]. Il est donc primordial que pour assumer leur transformation économique, les pays en développement accèdent à de nouvelles techniques et promouvoir les recherches essentiellement en matière agricole et de nutrition. Les transferts de technologie, si menés d'une manière appropriée, aident ces pays à faire face à cette innovation permanente. L'un des objectifs visés dans cette étude est donc de contribuer à une possibilité de Madagascar à faire face à la mondialisation. Il est aussi primordial que les transferts de technologies puissent résoudre des problèmes socio-économiques particuliers [GER 20]. Dans notre cas par exemple, le transfert de technologie répond à des problèmes de santé publique et de sécurité des consommateurs. En effet, les producteurs de cosmétiques à l'échelle artisanale sont florissants sur le marché local, et la connaissance de la pharmacopée traditionnelle par la population de masse est un facteur favorable à l'épanouissement de cette activité [ORU 19]. Aucun contrôle de non nocivité n'est effectué sur la plupart de ces produits mis sur le marché. Le second objectif de cette recherche est donc de vulgariser une technique simple, facilement à disposition, pour un minimum d'assurance des consommateurs de cosmétiques naturelles locales.

Récemment, deux modèles de couveuses électriques à faible consommation d'énergie ont été proposés par des collègues chercheurs du continent Africain, au Cameroun et en Afrique du Sud. Les deux sont basés sur une optimisation de l'utilisation de l'électricité pour en faire un appareil plus économique [KAP 20] [KUT 19]. Néanmoins, à cause des fréquentes coupures électriques à Madagascar, il serait souhaitable de choisir une source d'énergie alternative. Un modèle utilisant l'énergie solaire a été proposé au Nigeria [OSA 18]. Dans l'optique de minimiser l'investissement, nous proposerions dans cette étude la couvaison naturelle. En effet, afin d'encourager la vulgarisation facile de cette technique, un modèle peu coûteux en terme de technologie, d'investissement et de mise en oeuvre serait de choix. A Madagascar, le budget alloué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur représente seulement 2,83% des dépenses étatiques en 2022 [MIN 22]. En conséquence, très peu d'investissement est effectué dans le pays dans les améliorations technologiques. Pour prôner la sécurité des consommateurs, il serait donc plus approprié de diffuser une méthode de contrôle d'innocuité des produits qui serait de très bas prix.

## 3. Matériels et méthodes

### 3.1. Matériels et réactifs

Le désinfectant utilisé pour le traitement des matériaux de couvaison était un antimicrobien acheté sur le marché local, de marque Virunet de la Société Laprovet. La solution isotonique de chlorure de sodium a été achetée en pharmacie, celle pour perfusion a été choisie. Le matériel de

couvaison constitué de soubique en fibre végétale a été acheté dans le marché local. Des herbes ont été cueillies aux alentours et séchées puis traitées au désinfectant pour constituer la litière. Toutes les matières premières utilisées pour la confection de produits cosmétiques ont été achetées chez un revendeur local de produits d'importation.

### 3.2. Préparation des œufs

12 œufs issus d'une fécondation naturelle ont été mis à couver par une poule de grande taille comme le montre la figure 1. La poule est de race locale [RAZ 21]. Les œufs ont été déposés à la manière de l'élevage extensif traditionnel. La poule fournissait elle-même la température, l'humidité et la ventilation nécessaires pour l'évolution de l'embryon. Aucun dispositif de vérification de température ni d'humidité n'a été utilisé. Au dixième jour, avant de procéder à la mise en œuvre du test, la viabilité et le développement vasculaire de chaque œuf ont été vérifiés par mirage avec une lampe torche (figure 2).



**Figure 1.** Couvaison des œufs



**Figure 2.** Mirage des œufs avec une lampe torche

### 3.3. Mise en œuvre du test HET-CAM

Le protocole d'étude décrit par Ma MSC *et al*, 2020 [MAM 20] a été adopté avec quelques modifications. Brièvement, la trace de la poche d'air des œufs de 10 jours a été marquée puis la coquille a été entaillée délicatement à ce niveau. La membrane sous-jacente a été ensuite humidifiée avec de la solution isotonique de NaCl préalablement tiédie au bain marie. Après élimination de cette solution, la membrane a été enlevée afin de découvrir la membrane chorioallantoïdienne sous-jacente. Les produits à tester ont été dissous préalablement à 37% vol/vol dans de la solution isotonique de NaCl. Cette dernière a été utilisée comme produit appliqué sur les œufs témoins. Le temps d'application a été de 20 secondes, puis la membrane a été rincée avec de la solution de NaCl à 0,9%. A ce moment le chronomètre a été déclenché et le temps d'apparition de différents symptômes a été relevé. Les symptômes observés ont été décrits selon les critères stipulés dans

l'annexe IV de l'arrêté ministériel Français du 29 Novembre 1996 relatif au contrôle des produits cosmétiques [ARR 96]. Ils sont résumés dans le tableau 1 ci-après

Phénomènes	Description
<b>Hyperémie</b>	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
<b>Hémorragie</b>	Libération de sang s'échappant des vaisseaux et/ou des capillaires, pouvant se présenter sous différents aspects en chou-fleur, en nappe, en voile diffus, en piqueté
<b>Coagulation</b>	2 sortes de phénomènes peuvent être observées : Opacité : apparition sur tout ou en partie de la membrane, soit d'un voile opalescent évoluant éventuellement vers une opacification, soit d'une opacification directe. Thrombose : rupture du flux sanguin dans les vaisseaux se traduisant par un aspect segmenté, alternance d'étranglements et de zones turgescents plus ou moins sombres.

**Tableau 1.** Description des phénomènes observés sur la membrane chorioallontoïdienne

En fonction de leurs délais d'apparition, les symptômes observés ont aussi été évalués numériquement selon le score avancé par Luepke et Kemper, 1986 [LUE 86]. La méthode de détermination du score est résumée dans le tableau 2. L'expérience a été conduite en triplicat et la valeur donnée en résultat est la moyenne des trois scores. Les critères d'interprétation des scores sont donnés dans le tableau 3.

Il est à noter que l'opérateur de laboratoire ne connaît ni la nature des produits à tester ni leur composition. Des codes de trois chiffres ont été attribués pour éviter toute déformation d'interprétation des résultats.

### 3.4. Test d'irritabilité sur oreille de lapin

Le protocole décrit par Ahmad Khan *et al*, 2016 [AHM 16], pour le test d'irritation induit par des produits phénoliques a été adopté avec quelques modifications. 0,3 g de chaque produit a été directement appliqué pendant 20 s sur la partie interne de l'une des oreilles d'un lapin et les phénomènes d'irritation ont été notés. La solution isotonique de NaCl a été utilisée pour le traitement de l'autre oreille comme témoin.

Phénomène	Temps	Score
Hyperémie	t inférieur ou égal à 30 s	5
	t supérieur à 30 s et inférieur ou égal à 2min	3
	t supérieur à 2 min et inférieur ou égal à 5min	1
Hémorragie	t inférieur ou égal à 30 s	7
	t supérieur à 30 s et inférieur ou égal à 2min	5
	t supérieur à 2 min et inférieur ou égale à 5min	3
Coagulation	t inférieur ou égal à 30 s	9
	t supérieur à 30 s et inférieur ou égal à 2min	7
	t supérieur à 2 min et inférieur ou égal à 5min	5

**Tableau 2.** Méthode de notation en fonction du temps d'apparition des symptômes

Valeurs des scores N	Classification
N inférieur à 1.	Pratiquement non irritant
N supérieur ou égal à 1 et inférieur à 5.	Faiblement irritant
N supérieur ou égal à 5 et inférieur à 9.	Modérément irritant
N supérieur ou égal à 9.	Irritant

**Tableau 3.** Critères d'interprétation des scores

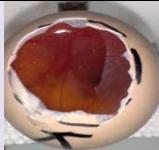
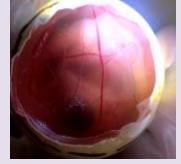
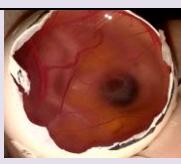
### 3.5. Préparation des produits à tester

Trois produits ont été confectionnés au laboratoire pour les tests. Le premier produit, codé 016 est une crème à base de Kaolin, de cire émulsifiante et de glycérine. Pour le second produit, codé 853 un extrait de plante de la famille des Euphorbiacees a été incorporé au premier produit ainsi qu'un conservateur à base d'acide benzoïque. Il s'agit d'extrait hydroalcoolique de *Jatropha curcas* L.. Le troisième produit codé 002 était un colloïde à base de polymère d'acide acrylique couramment utilisé dans les produits cosmétiques avec le même conservateur à base d'acide benzoïque. Pour les émulsions, l'huile de tournesol *Helianthus annuus* L. Asteracees a été utilisée comme phase huileuse et de l'eau filtrée a été utilisée comme phase aqueuse. L'objectif dans la confection de ces produits a été de confirmer l'irritabilité de l'extrait et aussi de voir l'innocuité du polymère d'acide acrylique très utilisé comme ingrédient de plusieurs produits cosmétiques sur le marché local.

## 4. Résultats et interprétations

### 4.1. Résultats des tests sur les oeufs

Le tableau 4 montre les résultats des tests selon les différents produits.

Code produit	Oeufs	Phénomènes	Durée d'apparition	Scores	Total des scores
016		Hyperémie	01min 20s	3	3
		Hémorragie	0s		
		Coagulation	0s		
		Hyperémie	01min 30s	3	3
		Hémorragie	0s		
		Coagulation	0s	3	
		Hyperémie	00min 56s		3
		Hémorragie	0s		
		Coagulation	0s		
853		Hyperémie	01min 40s	3	8
		Hémorragie	0s		
		Coagulation	03min 40s	5	
		Hyperémie	01min 00s	3	8
		Hémorragie	0s		
		Coagulation	03min 20s	5	
		Hyperémie	02min 30s	1	6
		Hémorragie	0s		
		Coagulation	04min 00s	5	
002		Hyperémie	00min 23s	5	15
		Hémorragie	01min 30s	5	
		Coagulation	03min 00s	5	
		Hyperémie	00min 10s	5	19
		Hémorragie	00min 30s	7	
		Coagulation	01min 31s	7	
		Hyperémie	00min 16s	5	17
		Hémorragie	00min 45s	5	
		Coagulation	1min 40s	7	

**Tableau 4.** Observation des résultats sur les membranes des oeufs

Les moyennes des scores par produit ainsi que leur classification selon leur potentiel irritant sont résumées dans le tableau 5.

Codes Produits	Moyenne des scores	Classifications
016	3,00	Faiblement irritant
853	7,33	Modérément irritant
002	17,00	Irritant

**Tableau 5.** Interprétation des résultats et classification des produits selon le test HET-CAM

Il a été constaté que la crème à base de kaolin et de glycérine ne présente qu'un faible potentiel irritant. Les extraits de *Jatropha curcas* sont des produits réputés toxiques pour la peau. Cette toxicité a été attribuée aux esters de phorbols, mais une récente publication a révélé l'existence d'autres molécules de type acide hydroxyoctadecenoïque [WAN 20]. Le kaolin a été utilisé depuis de centaines d'années comme agent protecteur de la peau et pour contrer l'irritation [SAN 21]. La glycérine est un agent humectant et également protecteur [BEC 19]. L'effet synergique de ces deux produits démontre une certaine efficacité pour la protection contre l'irritation. La différence de score entre les deux produits 853 et 016 est seulement de 4,33, l'effet des extraits d'Euphorbiacees est rendu modéré. Par contre, le score du produit 002 est très élevé. Il serait donc nécessaire de faire le contrôle d'innocuité de tous les produits lancés sur le marché malgache contenant ce polymère d'acide acrylique, notamment, les gels hydroalcooliques. Le taux d'incorporation de ce polymère n'a pas dépassé celui conseillé dans la fiche technique du produit. Dans cette même fiche aucune indication sur les possibilités d'effets négatifs et en particulier, les interactions avec d'autres ingrédients, comme le conservateur n'a été mentionnée. C'est l'une des raisons qui justifierait la nécessité de l'utilisation de ce test par les confectionneurs de produits cosmétiques, surtout à l'échelle artisanale et familiale.

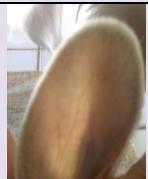
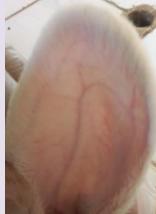
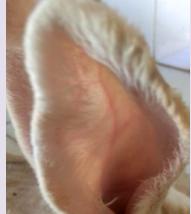
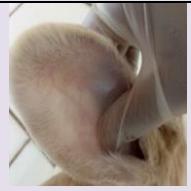
#### 4.2. Résultats des tests sur oreilles de lapin

Les comparaisons des phénomènes observés sur les oreilles témoins et les oreilles traitées sont montrées dans le tableau 6. Seul le produit 002 a provoqué des réactions pour les lapins. Ce modèle utilisant les lapins n'est donc pas assez sensible, comparé au modèle utilisant la membrane chorioallontoïdique de l'œuf de poule. La plupart des laboratoires des Universités de Madagascar utilisent ce modèle de test sur oreilles de lapins ou sur oreilles de souris comme moyens de vérification du pouvoir irritant des produits. Il est donc possible que plusieurs produits considérés comme non irritants le seraient encore dans la réalité pour plusieurs sujets.

#### 4.3. Discussions générales

Le test HET CAM s'avère plus sensible et plus précis. Il est très facile à mener et il s'adapte très bien au contexte malgache, ne nécessitant pas un grand investissement. Il serait donc bénéfique de vulgariser ce test au niveau des opérateurs économiques oeuvrant dans la production de cosmétiques naturels, une activité florissante à Madagascar. Nous avons démontré que la manipulation du test et toutes les connaissances y afférentes sont totalement maîtrisées au cours de ce transfert de technologie. Ce test remplit des critères de décision multiples qui sont requis dans le cadre d'un tel transfert [ORJ 21] :

- critère de qualité : il démontre une plus haute précision que l'autre test déjà pratiqué couramment dans les laboratoires des Universités de Madagascar

Codes Produits	Oreilles témoins	Oreilles traitées	Observations
016			Aucune réaction
			Aucune réaction
853			Aucune réaction
			Aucune réaction
002			Erythème
			Erythème avec escarre

**Tableau 6.** Résultats des tests sur oreille de lapin

- critère de coût : coût très faible, il est facilement réalisable avec des techniques d'élevage très courantes à Madagascar. Sa rapidité ne nécessite même pas une grande dépense pour la nourriture de la poule qui couve les œufs, puisque la durée de la couvaison est au maximum de 10 jours.

- critère de complexité : technologie très facile à acquérir, notre équipe a réalisé ce test sur une veille bibliographique. Nous n'avions même pas eu besoin de travailler avec un laboratoire partenaire pour nous former dans l'aspect scientifico-technique de sa mise en œuvre.

- critère d'efficacité : il est reconnu aussi dans d'autres pays en développement comme une technique simple mais assez sensible et facile à réaliser [MOU 20].

## 5. Conclusion

La faisabilité du test HET-CAM dans un contexte malgache a été confirmé en l'appliquant dans le contrôle de trois produits cosmétiques. Le premier était une crème à base de kaolin et de glycérine. Ce produit a été comparée avec une autre crème ayant les mêmes ingrédients de base, mais à laquelle a été rajouté un extrait de plante réputée toxique pour la peau à cause des esters de phorbol : le *Jatropha curcas* L. EUPHORBIACEES. La première crème a eu un score de 3, faiblement irritant avec le test HET-CAM et la deuxième a eu un score de 7,33, modérément irritant. Ce résultat a en même temps démontré l'efficacité de l'action synergique du kaolin et de la glycérine pour la protection contre l'irritation cutanée. Le troisième produit était un gel colloïdal à base de polymère d'acide acrylique avec un conservateur à base d'acide benzoïque. Le test a montré une forte irritabilité de ce gel avec un score de 17.

La mise en œuvre du test HET-CAM dans le contexte de Madagascar est réussie, sans utilisation de couveuse, mais en optant pour la couvaison naturelle. La désinfection du lieu de couvaison est primordiale, ainsi que le maintien de l'hygiène de l'animalerie. Une poule de race locale a été utilisée et la technique s'avère très peu couteuse puisqu'il s'agit seulement d'une couvaison pendant 10 jours. La dépense en nourriture de la poule pendant ces jours est bien loin inférieure à la dépense en électricité. Les mêmes règles d'hygiène s'imposent pour le test sur oreille de lapin, et les dépenses financières pour l'alimentation sont comparables avec celle de la couvaison par une poule. Par contre, les résultats ont évoqué que le test sur oreille de lapin est moins sensible et moins précis que le test HET-CAM.

Ce transfert de technologie s'adapte donc parfaitement au contexte malgache, compte tenu des contraintes techniques et financières du pays. Il répond à un besoin réel de sécurité des consommateurs au niveau du marché local. Il contribue également au développement économique du pays, en offrant une possibilité de réponse à l'une des exigences du marché international ouvrant la voie à une meilleure opportunité d'exportation de produits cosmétiques naturels.

Maintenant que la faisabilité de ce test à Madagascar est démontrée, il est préconisé de le vulgariser au sein des petits producteurs familiaux et artisanaux. Un test d'irritation de tous les produits mis sur le marché malgache contenant le polymère d'acide acrylique devrait être effectué. L'introduction de ce test dans les normes nationales sur la sécurité des produits cosmétiques serait un des moyens de protéger les consommateurs locaux.

## Bibliographie

- [AHM 16] AHMAD KHAN I. ET AL., « Dermatological evaluation of counter irritant effect of methanol leaf extract of *Rumex vesicarius* Linn. in rabbits», *JPak Med Assoc* 2016.
- [ARR 96] ARRETE MINISTERIEL., « Arrêté du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques», 1996.
- [AUD 14] AUDERTSCH D.B., « Technology transfer in a global economy», *Journal of Technology Transfer*, 39, 301-312, 2014.
- [BEC 19] BECKER L.C., « Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics», *International Journal of Toxicology*, 38, 3, 6S – 22 S, 2019.
- [BUD 21] BUDAI P., « Comparative evaluation of HET-CAM and ICE methods for objective assessment of ocular irritation caused by selected pesticide products », *Toxicology in vitro*, 74, 105150, 2021.
- [DER 17] DEROUCHE M.T.T. ABDENOUR S., « HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries», *Toxicology in vitro*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.024>, 2017.

[FER 21] FERREIRA M.S. ET AL., « Trends in the Use of Botanicals in Anti-Aging Cosmetics. », *Molecules*, 26, 3584, 2021

[GER 20] GERLI F ET AL, « Technology Transfer for Social Entrepreneurship: Designing Problem-Oriented Innovation Ecosystems », *Sustainability*, 13, 20, 2021.

[JOU 09] JOURNAL OFFICIEL DE L’UNION EUROPEENNE, *Règlement (CE) N° 1223/2009 du parlement Européen et du Conseil*, L342, 59-208, 2009.

[KAP 20] JAPEN P.T., « Design and prototyping of a low-cost, energy efficient eggs incubator in developing countries: A case study of Cameroon », *Scientific African*, 10, e0618, 2020.

[KUT 19] KUTSIRA G.V. ET AL., « Development of a Small Scaled Microcontroller-Based Poultry Egg Incubation System », dans *2019 International Artificial Intelligence and Data Processing Symposium*, Malatya, Turkey, 2019.

[LAM 21] LA MESA C ET AL, « Natural Products from Madagascar, Socio-Cultural Usage, and Potential Applications in Advanced Biomedicine: A Concise Review», *Molecules*, 26, 4507, 2021.

[LUE 86] LUEPKE N.P., KEMPER F.H. « The Het-Cam Test: An Alternative To The Draize Eye Test», *Fd Chem. Toxic*, 24, 6, 7, 495-496 , 1986.

[MAM 20] MA MSC X. ET AL, « Skin irritation potential of cosmetic preservatives: An exposure-relevant study», *J. Cosmet Dermatol* , 00, 1-9, 2020.

[MIN 22] MINISTÈRE DE L’ÉCONOMIE ET DES FINANCES A MADAGASCAR. « Budget des citoyens relative à la loi de Finances 2022», LFI 2022.

[MOU 20] MOUFID B, ABDERRAHIM S.L., « Vue d’ensemble sur les techniques in vitro en Toxicologie : focus sur la technique HET-CAM » , *Mémoire en vue de l’obtention du diplôme de Master II*, Domaine Sciences de la Nature et de la Vie, Filière Biologie, Spécialité Toxicologie, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi, Algérie, 2020.

[ORJ 21] ORJUELA-GARZON W.A., ET AL, « Trends in the use of multi-criteria decision-making methods in Technology transfer processes (a critic review) » , *International Journal of Agricultural Extension*, 9, 3, 533 – 557, 2021.

[ORU 19] ORUEZABALA G., RAMANDIMBIARISON L.R., « La perception floue d’une segmentation stratégique : cas de l’éco-labellisation des cosmétiques naturels à Madagascar », *Revue des Sciences de Gestion*, 296, 2, 23-24, 2019.

[OSA 18] OSANYINPEJU K.L. ET AL., « Development of a Solar Powered Poultry Egg Incubator for South West Nigeria», *International Journal of Innovative Research and Creative Technology*, 3, 6, 2018.

[PAT 19] PAT 0 ET AL, « Parks and Reserves in Madagascar: Managing Biodiversity for a Sustainable Future», *Protected Areas, National Parks and Sustainable Future*, DOI: 10.5772/intechopen.85348, 2019.

[RAZ 21] RAZAFINDRAFARA M.S., « Overview of domestic poultry farming in Madagascar», *International Journal of Agriculture Extension and Social Development*, 4, 2, 22-28, 2021.

[RIB 16] RIBBATTI D., « The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), a multifaceted experimental model », *Mechanisms of Development*, 2016.

[SAN 21] SANTIWORAKUN N.Y. ET AL., « Formulation and Stability Determination of Anti-Acne Cream Containing Black Cumin Seed Oil and Kaolin Clay », *Proceeding on International Halal Science and Technology Conference*, 1,1, 156-163, 2021.

[UNE 17] UNESCO « Dépenses en Recherche et Développement en % du PIB », <https://donnees.banquemondiale.org/indicateur/GB.XPD.RSDV.GD.ZS?locations=MG>, 2017.

[VIN 17] VINARDELL M.P., MITJANS M., « Alternative Methods to Animal Testing for the Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients: An Overview », *Molecules*, 4,30, 2017.

[WAN 20] WANG X.H. ET AL, « Hydroxy-octadecenoic acids instead of phorbol esters are responsible for the Jatropha curcas kernel cake’s toxicity », *Communications Biology*, 3, 228, 2020.