

**ETUDE D'INNOCUITE PAR VOIE ORALE CHEZ LE RAT  
DOSE LIMITE  
SELON PROTOCOLE OCDE 84/449 L251 DU 25/04/84**

~ ESSAI N°IVO 00116 ~

**PROMOTEUR DE L'ETUDE :**  
ECOSYSTEM  
3 RUE DU PARC  
28140 - TERMINIERS

REFERENCE PRODUIT : 96,  
Vitaliseur Bio Best

**RAPPORT FINAL NUMERO : 00330**

DATE : 10/11/00

DATE : 11/10/00

**INSTALLATION D'ESSAIS**

**LABORATOIRE ESD**  
ROMANS  
01400 / CHATILLON SUR CHALARONNE

**DIRECTEUR DU LABORATOIRE**  
Monsieur Jean-Louis RABILLARD  
*Maîtrise de Biologie*  
Autorisation d'expérimenter N°02537

**DIRECTEUR D'ETUDE**  
Monsieur Jacques BOUFFECHOUX  
*Pharmacien expert toxicologue*  
Autorisation d'expérimenter N°006400

**SUPERVISEUR D'ETUDE**  
Monsieur Gilles FROPIER  
*Technicien supérieur en animalerie*

**TECHNICIEN**  
Monsieur Stéphane MAITREPIERRE  
*Technicien animalier*

**VETERINAIRE**  
Monsieur Bruno LENOIR

**ASSURANCE QUALITE**  
Monsieur Thierry BOUCHET

ADEQUAL  
ACREDITATION COFRAC (97) N°1-0810

**RAPPORT FINAL D'EXPERTISE**

**EXPERTISE DU DOSSIER**

**LABORATOIRE COSMEPAR**  
17 RUE DU CHEVALIER DE LA BARRE  
92130 ISSY LES MOULINEAUX

Agrément N°: A 92391.

**DIRECTEUR DU LABORATOIRE :**  
Monsieur Jacques BOUFFECHOUX  
*Pharmacien expert toxicologue*  
Autorisation d'expérimenter N°006400

**ASSURANCE QUALITE :**  
Christian GOBERT  
Gérant

**I - INTRODUCTION**

Cette étude a été réalisée selon les modalités définies dans le protocole COSMEPAR réf IVO00116, et concerne l'étude de l'innocuité d'un produit par administration orale d'une dose unique.

**2 - SUBSTANCE D'ESSAI**

**Dénomination** : 96, Vitaliseur Bio Best

**Nature** : LIQUIDE

**Réception le** : 17/10/00

**Code N°** : 00330

**Stockage** : température ambiante en flacons stériles

**Contrôle avant étude :**

Stabilité : conforme

Homogénéité : conforme

**Modalités d'administration :**

Produit utilisé tel que fourni par le commanditaire de l'étude.

Voir partie 6-A PREPARATION DU PRODUIT

**3 - DESCRIPTION DES MATERIAUX ET  
METHODES D'ESSAI**

**3.1 - MATERIAUX**

5 rats mâles + 5 rats femelles de souche SPRAGUE-DEWLEY.

**Provenance :**

Elevage DEPRE ou IFFA CREDO.

**Date d'arrivée au laboratoire :** 19/10/00

**Identification des animaux :**

Marquage à l'acide picrique : 1M/2M/3M/4M/5M/1F/2F/3F/4F/5F

Date d'administration du produit : 24/10/00

Date de fin de l'étude : 07/11/00

### 3.2 - METHODE D'ESSAI

Test d'innocuité chez le rat en administration orale d'une dose unique selon la méthode dérivée de la directive OCDE n° 401 du 24/02/87 et de la CEE 92/69/CEE, B1 du 31/07/92.

### LIEU DE STOCKAGE DES DOCUMENTS ET SPECIMENS

Les rapports seront archivés pendant une durée de 5 ans au siège social du Laboratoire COSMEPAR - 17 RUE DU CHEVALIER DE LA BARRE - 92130 ISSY LES MOULINEAUX.

Les données brutes et les spécimens seront conservés pendant une durée de 5 ans dans les locaux du Laboratoire ESD ROMANS - 01400 CHATILLON SOUS CHALARONNE

A la fin de la période d'archivage des dossiers, des données brutes et des spécimens; les données seront détruites.

### ASSURANCE QUALITE

L'assurance qualité s'assure que les procédures de travail relatives à ce type d'étude sont rigoureusement suivies par des inspections périodiques réalisées au hasard, au cours de l'année.

Les données figurant dans le rapport d'expérimentation sont auditées par l'Assurance Qualité conformément aux procédures en vigueur dans le centre.

### \* ATTESTATION DE L'ETUDE ET DES RESULTATS

Je soussigné, **Jacques BOUFFECHOUX**, Pharmacien diplômé de l'Université de PARIS V, A.I.H.P.-I.P.I, membre de la Société Française de Toxicologie, certifie que l'expertise de ce rapport a été effectuée sous ma responsabilité dans les locaux du Laboratoire COSMEPAR S.A.R.L 17 RUE DU CHEVALIER DE LA BARRE - 92130 ISSY LES MOULINEAUX.

**Jacques BOUFFECHOUX**  
*Directeur du Laboratoire*

Date : 10/11/00

### \* DECLARATION DE L'ASSURANCE QUALITE - DOCUMENTAIRE

L'étude dont les résultats sont présentés dans le rapport s'est déroulée conformément au protocole, selon les procédures standards en vigueur dans le laboratoire d'étude. Le rapport reflète les données brutes acquises au cours de l'étude.

**Christian GOBERT**  
*Gérant*  
*Assurance Qualité*

Date : 10/11/00

### RESUME DES RESULTATS

Les données brutes individuelles figurent dans l'annexe jointe au rapport. L'observation des animaux pendant 2 semaines et la mortalité dans les deux lots d'animaux en fonction de la quantité de produit administrée donnent l'indication de la toxicité du produit ramenée en grammes ou millilitres par kilo de poids d'animal :

Le produit 96, Vitaliseur Bio Best a été administré à deux lots de rats mâles et femelles à la dose de **2g/kg**.

La méthodologie utilisée pour cette étude est celle dérivée du protocole inscrit dans la directive OCDE n° 401 du 24/02/87 et de la CEE 92/69/CEE, B1 du 31/07/92.

**La mortalité dans les deux lots d'animaux a été nulle.**

### CONCLUSION

Dans ces conditions le produit :

**96, Vitaliseur Bio Best ne présente pas de toxicité à la dose de 2g/kg en administration orale unique, dans les conditions expérimentales retenues.**

### CLASSIFICATION

Concernant l'innocuité par voie orale selon la directive de la direction 93/21/CEE, le produit :

**96, Vitaliseur Bio Best ne devrait pas être classé.**

# ANNEXE I

## RAPPORT D'ETUDE N°00330 – PROTOCOLE - ESSAI IVO N°00116

Essai d'innocuité par administration orale unique chez le rat, épreuve limite, selon un protocole dérivé de la directive OCDE n° 401 du 24/02/87 et de la CEE 92/69/CEE, B1 du 31/07/92.

**COMMANDITAIRE :**  
**ECOSYSTEM**  
3 RUE DU PARC  
28140 - TERMINIERS

**REFERENCE PRODUIT :**

**96, Vitaliseur Bio Best**

**MONITEUR DE L'ETUDE, EXPERTISE DU RAPPORT**

**LABORATOIRE COSMEPAR**  
17 RUE DU CHEVALIER DE LA BARRE  
92130 ISSY LES MOULINEAUX

**LIEU DE REALISATION**

**LABORATOIRE ESD**  
ROMANS  
01400 CHATILLON SUR CHALARONNE

### 1 - OBJECTIF

L'objectif de l'étude réalisée selon le présent protocole est d'évaluer la toxicité d'une substance après administration orale unique d'une dose maximale.

### 2 - METHODOLOGIE

L'étude est menée conformément aux règles des Bonnes pratiques de Laboratoires selon un protocole inspiré de la directive CEE 92/69/CEE, B1 du 31/07/92.

### 3 - PRODUIT

Dénomination : **96, ANTIOXYDANT NOUVELLE**

#### GÉNÉRATION

Nature du produit : LIQUIDE

Dès réception, le produit est immédiatement enregistré puis stocké selon les consignes fournies par le commanditaire. Aucune identification particulière du produit n'ayant été demandée les résultats présentés dans ce rapport ne concernent que l'échantillon reçu. Le commanditaire demeure responsable de l'identité entre cet échantillon et un produit éventuellement mis sur le marché.

### 4 - MATERIEL

#### A - ANIMAUX

ESPECE : RAT ALBINOS  
SOUCHE : SPRAGUE-DEWLEY  
SEXE : mâle + femelle  
PROVENANCE : ELEVAGES DEPRE ou  
IFFA CREDO

POIDS : environ 250 g au moment de l'essai

#### ACCLIMATATION

7 jours au minimum dans l'animalerie du laboratoire où est réalisée l'expérimentation

#### STABULATION

Les animaux sont hébergés par 5 en cages polycarbonate aux dimensions normalisées 450x300x200 munies d'une grille de type E avec litière absorbante.

Ces cages sont placées dans une animalerie climatisée dont la température est de  $22 \pm 3$  degrés C et maintenue à un degré hygrométrique de 30 à 75% d'humidité relative.

L'air est filtré et évacué.

L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents produisant une lumière de type lumière du jour.

Le cycle nyctéméral artificiel est de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité.

#### ALIMENTATION :

Aliment A04 ; U.A.R – VILLEMORISSON  
91360 EPINAY SUR ORGE

#### EAU DE BOISSON:

Eau de ville distribuée à volonté dans des biberons en makrolon stérilisables munis de pipettes en acier inoxydable.

### B - APPAREILLAGE

- Seringues stériles à usage unique de 1, 2, 5 et 10 ml.
- Sonde œsophagienne courbe inox.
- Balance pour pesée d'animaux SARTORIUS  
Ref: U6100.

### 5 - PLAN EXPERIMENTAL

L'essai est réalisé sur un lot de 5 rats mâles + un lot de 5 rats femelles de J0 à J14.

- **J0**  
Pesée des animaux des deux lots.  
Administration du produit à la sonde munie d'une seringue à usage unique à raison de **2g/kg** de poids d'animal.  
Observation des animaux : T+1/4 heure ; T + 1 heure jusqu'à T+6 heures
- **J1 à J7**  
Observation quotidienne de l'état des animaux. S'il y a mortalité, on note avec le plus de précision possible le moment de la mort.
- **J7**  
Pesée des animaux survivants.
- **J7 à J14**  
Observation quotidienne des animaux.
- **J14**  
Pesée des animaux survivants

### 6 - PROCEDURE EXPERIMENTALE

Avant la réalisation de l'essai, les animaux doivent être maintenus en diète hydrique pendant 24 heures.

#### A - Préparation du produit

Dilution : Produit pur  
Véhicule : Néant

#### B - Administration du produit

##### 1- Produits liquides :

La dose de produit à administrer est mesurée à l'aide de la seringue jetable de 2 ou 5 ml, la sonde étant adaptée à la seringue. Le produit est administré à chaque animal à la dose unique définie et dépendant de la qualité du produit en étude, en accord avec le protocole et le commanditaire de l'étude.

##### 2- Produits solides ou visqueux:

Le produit à administrer est dilué dans le véhicule choisi à une concentration compatible avec sa solubilité, et suffisante pour éviter l'administration d'un volume trop important (voir A Préparation du produit).

Le volume de cette dilution à administrer est ensuite calculé en fonction du poids de l'animal, de manière à lui administrer la quantité prévue en produit pur.

Le mode d'administration est le même que dans le cas d'un produit liquide

#### C - Observation des animaux

##### Temps d'observation :

- Immédiatement après l'administration.
- 1/4heure après l'administration.
- 6 heures après l'administration.
- 1 fois par jour, 5 jours sur 7, pendant les 13 jours
- suivant l'administration.

#### 7 - TYPE D'EXAMENS CLINIQUES REALISES

##### A - Anomalies comportementales

- Apathie
- Excitation
- Ptôse palpébrale
- Léchage du pelage

##### B – Anomalies de la peau et des muqueuses

##### C - Signes traduisant une atteinte nerveuse partielle

##### ou généralisée

- Comas
- Tremblements
- Convulsions.

##### D - Signes traduisant une atteinte digestive

- Refus de nourriture ou de boisson
- Modification du volume ou de l'aspect des matières fécales

##### E - Signes traduisant un effet toxique corrosif et vasculaire

- saignement buccal,
- nasal,
- anal,

##### F - Mortalité éventuelle

#### 8 - EVOLUTION PONDERALE

Les animaux sont pesés à :

- J0 avant l'administration du produit, la dose de produit administré étant fonction du poids de l'animal.
- J7
- J14

L'évolution pondérale des 2 lots d'animaux est représentée sur un graphe d'évolution relative.

#### 9 - RESULTATS

Les observations cliniques réalisées pendant toute la durée de l'expérimentation sont regroupées sous forme de tableaux d'observations constituant les données brutes de l'étude. Les courbes de poids des deux lots d'expérimentation viennent à l'appui de la conclusion.

La mortalité éventuelle permet d'évaluer le degré de toxicité du produit et dans une telle éventualité de pratiquer une approximation de DL 50.

#### 10 - EVALUATION DES DONNEES

L'évaluation de l'innocuité ou de la toxicité du produit après une administration unique par voie orale chez le rat doit préciser la relation s'il y en a une, entre l'exposition des animaux au produit et l'incidence et la sévérité de toutes les anomalies, y compris les anomalies cliniques et comportementale, lésions macroscopiques, variations du poids corporel, mortalité et tout autre effet toxique.

### Le classement du produit est basé sur les critères suivants (directive du conseil 93/21/CEE) :

DL 50 voie orale oral route mg/Kg		Phrase de risque Hazard sentence	Indication de danger Hazard indication	Symbole Symbol
≤ 25	R28	Très toxique en cas d'ingestion <i>Very toxic if ingestion</i>	Très toxique <i>Very toxic</i>	T <sup>+</sup>
25 < et < 200	R25	Toxique en cas d'ingestion <i>Toxic if ingestion</i>	Toxique <i>Toxic</i>	T
200 < et < 2000	R22	Nocif en cas d'ingestion <i>Harmful if ingestion</i>	Nocif <i>Harmful</i>	X <sub>n</sub>
➤ 2000		Aucune <i>None</i>	Aucune <i>None</i>	Aucun <i>None</i>



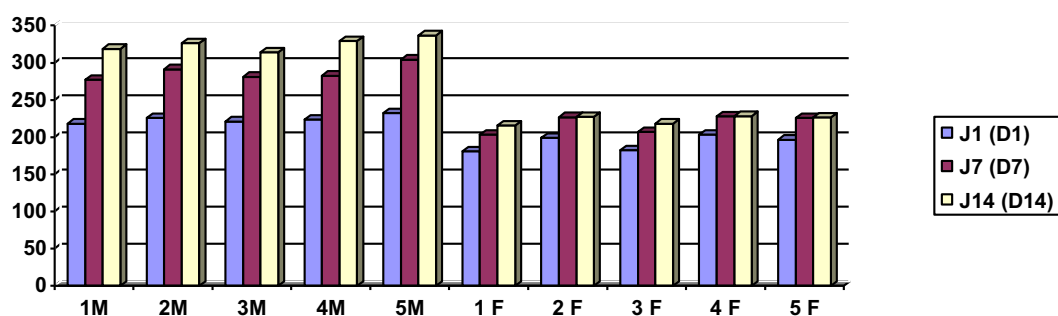
<b>J14</b>	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
<b>D14</b>	NTR	NTR	NTR	NTR	NTR	NTR	NTR	NTR	NTR	NTR

**ABBREVIATIONS USED:**

<b>AP</b> Apathy	<b>LE</b> Lethargy	<b>CO</b> Comas	<b>PP</b> Palpebral ptosis
<b>TR</b> Trembling	<b>CO</b> Convulsions	<b>DI</b> Diarrhea	<b>HM</b> state of the hair and mucosa
<b>NB</b> nasal bleeding	<b>BB</b> mouth bleeding	<b>AB</b> Anal bleeding	<b>RF</b> Refusal of food
<b>EX</b> Excitation	<b>RB</b> Refusal of beverage	<b>SAL</b> Salivation	<b>D</b> Death
NTR: Nothing to report		<b>LW</b> Loss of weight	

**EVOLUTION DES POIDS - POIDS EN GRAMMES**

ANIMAL N°	1M	2M	3M	4M	5M	1F	2F	3F	4F	5F
<b>J1 (D1)</b>	218,2	225,5	221,1	223,5	232,3	180,7	198,7	182,3	203,2	196,5
<b>J7 (D7)</b>	277,0	291,3	280,9	282,4	304,3	203,1	226,6	207,0	227,7	225,7
<b>J14 (D14)</b>	318,6	326,3	314,1	329,0	336,7	215,6	227,0	218,2	228,3	226,5



**ETUDE D'IRRITATION PRIMAIRE CUTANEE CHEZ LE LAPIN  
SELON LE J.O DE LA CEE DU 19/09/1984**

~ ESSAI N°IPO00117~ LIGNE DIRECTRICE O.C.D.E. 404

**PROMOTEUR DE L'ETUDE :** ECOSYSTEM  
3 RUE DU PARC  
28140 TERMINIERS

**REFERENCE PRODUIT :** 96, Vitaliseur Bio Best

**RAPPORT FINAL NUMERO :** 00330

**DATE :** 10/11/00

**INSTALLATION D'ESSAIS**

**LABORATOIRE ESD**  
ROMANS  
01400 CHATILLON SUR CHALARONNE

**DIRECTEUR DU LABORATOIRE :**  
**Monsieur Jean-Louis RABILLARD**  
Maitrise de Biologie  
Autorisation d'expérimenter N°02537

**DIRECTEUR DE L'ETUDE :**  
**Monsieur Jacques BOUFFECHOUX**  
Pharmacien expert toxicologue  
Autorisation d'expérimenter N°006400

**SUPERVISEUR D'ETUDE :**  
**Monsieur Gilles FROPIER**  
Technicien supérieur en animalerie

**TECHNICIEN :**  
**Monsieur Stéphane MAITREPIERRE**  
Technicien animalier

**VETERINAIRE :**  
**Monsieur Bruno LENOIR**

**ASSURANCE QUALITE :**  
**Monsieur Thierry BOUCHET**  
ADEQUAL

**ACCREDITATION COFRAC (97) N°1-0810**

**RAPPORT FINAL D'EXPERTISE**

**EXPERTISE DU DOSSIER**

**LABORATOIRE COSMEPAR**  
17 RUE DU CHEVALIER DE LA BARRE  
92130 ISSY LES MOULINEAUX  
Agrément N°: A 92391.

**DIRECTEUR DE L'ETUDE:**  
**Monsieur Jacques BOUFFECHOUX**  
*Pharmacien expert toxicologue*  
Autorisation d'expérimenter N°006400

**ASSURANCE QUALITE :**  
**Christian GOBERT**  
*Gérant*

## 1 - INTRODUCTION

Cette étude a été réalisée selon les modalités définies dans le protocole COSMEPAR réf IPO00117 et consiste à évaluer le potentiel irritant d'un produit sur la peau rasée du lapin albinos Néo-Zélandais.

## 2 - PRODUIT

**Dénomination :** 96, Vitaliseur Bio Best  
**Nature :** LIQUIDE

**Réception le :** 17/10/00

**Code N°:** 00330

**Stockage**  
A température ambiante en flacons stériles

**Contrôle avant étude :**  
**Stabilité :** conforme  
**Homogénéité :** conforme

**Modalités d'administration :**  
Produit pur,  
utilisé tel que fourni par le commanditaire de l'étude.

**Substance de référence :**  
Lauryl sulfate de sodium 10 %.

## 3 - DESCRIPTION DES MATERIAUX ET METHODE D'ESSAI

### 3.1 - MATERIAUX

3 lapins albinos de souche néo-zélandais

**Provenance :**  
ESD - ROMANS 01400 CHATILLON SUR CHALARONNE.

Date d'arrivée au laboratoire : 05/09/00

Identification des animaux :  
Marquage à l'oreille 028865-028958-028938

Date de début d'étude : 24/10/00

Date de fin d'étude : 27/10/00

### 3.2 - METHODE D'ESSAI

Essai d'irritation primaire cutanée chez le lapin en accord avec la méthode publiée au J.O. de la C.E.E. du 19/09/84.

### LIEU DE STOCKAGE DES DOCUMENTS ET SPECIMENS

Les rapports seront archivés pendant une durée de 5 ans au siège social du *Laboratoire COSMEPAR*  
17 RUE DU CHEVALIER DE LA BARRE - 92130 ISSY LES MOULINEAUX.

Les données brutes et les spécimens seront conservés pendant une durée de 5 ans dans les locaux du *Laboratoire ESD ROMANS 01400 CHATILLON SUR CHALARONNE*

A la fin de la période d'archivage des dossiers, des données brutes et des spécimens, les données seront détruites.

## 4 - ASSURANCE QUALITE

### \*ATTESTATION DE L'ETUDE ET DES RESULTATS

Je soussigné, **Jacques BOUFFECHOUX**, Pharmacien diplômé de l'Université de PARIS V, A.I.H.P.-I.P.I, membre de la Société Française de Toxicologie, certifie que l'expertise de ce rapport a été effectuée sous ma responsabilité dans les locaux du Laboratoire COSMEPAR S.A.R.L 17 RUE DU CHEVALIER DE LA BARRE - 92130 ISSY LES MOULINEAUX.

**Jacques BOUFFECHOUX**  
*Expert Toxicologue*  
*Docteur en Pharmacie*  
*Directeur du Laboratoire*

Date : 10/11/00

### \*DECLARATION DE L'ASSURANCE QUALITE - DOCUMENTAIRE

L'étude dont les résultats sont présentés dans le rapport s'est déroulée conformément au protocole, selon les procédures standards en vigueur dans le laboratoire d'étude. Le rapport reflète les données brutes acquises au cours de l'étude.

**Christian GOBERT**  
*Gérant*

**Assurance qualité**

Date : 10/11/00

### RESUME DES RESULTATS

Le produit : 96, Vitaliseur Bio Best a été appliqué sur la peau normale rasée de 3 lapins à la dose de 0.5 ml pendant 4 heures.

La méthodologie utilisée pour cette étude est celle publiée au J.O. de la C.E.E. du 19/09/84.

TOTAL 1H					TOTAL J1					TOTAL J2					TOTAL J3				
E	O	D	So	N	E	O	D	So	N	E	O	D	So	N	E	O	D	So	N
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOYENNE 0					MOYENNE 0					MOYENNE 0					MOYENNE 0				

#### MOYENNE J3 :

L'observation de la peau aux temps 1, 24, 48, et 72 heures après enlèvement du pansement, montre:

L'absence de lésions irritatives cutanées. La tolérance locale est bonne.

En conséquence, il peut être classé comme :

**NON IRRITANT**

#### CONCLUSION

**Le produit 96, Vitaliseur Bio Best a un pouvoir irritant TRES FAIBLE**

*Selon le protocole défini au J.O. de la C.E.E. du 19/09/84 dans les conditions expérimentales retenues.*

Le produit ne provoque pas de lésions irritatives cutanées

spécifiques chez le lapin albinos, dans le sens de la

directive CEE du 19/09/84.

## ANNEXE I - RAPPORT D'ETUDE N°00330 - PROTOCOLE - ESSAI N°IPO00117

Essai d'irritation primaire cutanée sur le lapin albinos selon le protocole publié au J.O. de la C.E.E. du 19/09/84.

### REFERENCE PRODUIT

96, Vitaliseur Bio Best

### COMMANDITAIRE :

ECOSYSTEM  
3 RUE DU PARC  
28140 TERMINIERS

### MONITEUR DE L'ETUDE, EXPERTISE DU RAPPORT

LABORATOIRE COSMEPAR  
17 RUE DU CHEVALIER DE LA BARRE  
92130 ISSY LES MOULINEAUX

### LIEU DE REALISATION

LABORATOIRE ESD  
ROMANS  
01400 CHATILLON SUR CHALARONNE

### 1 - OBJECTIF

L'objectif de l'étude réalisée selon le présent protocole est d'évaluer la tolérance cutanée d'une substance sur le lapin albinos après une application unique de 4 heures.

### 2 - METHODOLOGIE

L'étude est menée conformément aux règles des Bonnes Pratiques de Laboratoires, selon la méthode publiée au J.O. de la C.E.E. du 19/09/84.

### 3 - PRODUIT

Dénomination : 96, Vitaliseur Bio Best  
Nature : LIQUIDE

Dès réception, le produit est immédiatement enregistré, puis stocké selon les consignes fournies par le commanditaire.

Aucune identification particulière du produit n'ayant été demandée, les résultats présentés dans ce rapport ne concernent que l'échantillon reçu. Le commanditaire demeure responsable de l'identité entre cet échantillon et un produit éventuellement mis sur le marché.

### 4 - MATERIEL

#### 4.1 - ANIMAUX

ESPECE : LAPIN ALBINOS.

SOUCHE : Néo-Zélandais.

SEXE : Mâle.

#### PROVENANCE :

ESD - ROMANS  
01400 CHATILLON SUR CHALARONNE

### POIDS :

Environ 2 à 2,5 kg au moment de l'essai.

### ACCLIMATATION :

5 jours au minimum dans l'animalerie du laboratoire où est réalisée l'expérimentation.

### STABILISATION :

Les animaux sont hébergés en cages individuelles en inox aux dimensions normalisées, avec plancher ajouré.

Ces cages sont placées dans une animalerie climatisée dont la température est comprise entre 18 et 22° C et maintenue à un degré hygrométrique entre 30 et 80% d'humidité relative.

L'air est filtré et évacué.

L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents produisant une lumière de type lumière du jour.

Le cycle nyctéméral artificiel est de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité.

### ALIMENTATION :

Aliment Réf. 110-10 ; U.A.R - 91360 EPINAY SUR ORGE

### EAU DE BOISSON :

Eau de ville filtrée à 0.2µ distribuée à volonté par pipettes automatiques.

### 4.2 - APPAREILLAGE

Table de contention inox.

Seringues stériles à usage unique de 1, 2, 5ml, dans le cas de produits liquides.

Spatule et balance dans le cas de produits solides.

Tondeuse électrique à peigne chirurgical, hauteur de coupe 0,05 mm.

Patchs formés d'un rectangle de sparadrap adhésif 10 x 7 cm (3M BLENDERM) collé sur un scotch microporeux sur laquelle est déposée la compresse de gaze 2,5 x 2,5 cm imprégnée du produit à doser.

L'ensemble est maintenu autour du tronc avec une bande de gaze élastique et une bande de sparadrap aéré (OMNIFIX) hypoallergénique.

Un gilet de maintien de tissu plastifié aéré avec accrochage par velcro est placé par dessus l'ensemble de pansements précédemment décrit.

### 5 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

#### 5.1 - PLAN EXPERIMENTAL

L'essai est réalisé sur un groupe de 3 lapins.

Pour chaque animal, le produit est appliqué sur la peau rasée du dos.

## 5.2 - AJUSTEMENT DES DOSES

0,5ml ou 0,5g de produit.

## 5.3 - FORME D'ADMINISTRATION

Produit pur.

## 5.4 - MODALITES D'ADMINISTRATION

Le produit est appliqué directement sur la peau du côté gauche de l'animal, la partie de peau adjacente servant de témoin négatif. Il est recouvert d'une pièce de gaze.

Les pièces de gaze sont maintenues en contact par le dispositif décrit plus haut.

**L'ensemble est laissé pendant 4 heures.**

## 5.5 - PROCEDURE EXPERIMENTALE

Avant la réalisation de l'essai, le dos et le flanc des 3 lapins sont rasés à la tondeuse pour dégager une surface d'environ 14x14cm. Ne sont utilisés que des animaux ayant une peau impeccable, non irritée.

Le jour de l'essai, le produit est déposé sur la peau selon les modalités ci-dessus.

Après enlèvement du pansement, toute trace de produit est éliminée à l'aide d'eau distillée ou d'un solvant approprié si besoin est.

L'irritation est mesurée après 1, 24, 48, et 72 heures jusqu'à 7 jours si nécessaire.

Au cas où l'irritation persiste, les observations sont prolongées tous les jours jusqu'à réversibilité sans excéder 14 jours.

## 6 - EXPRESSION DE L'IRRITATION

L'évaluation est faite sur la partie traitée en se référant comme témoin négatif à la peau adjacente, selon l'échelle suivante :

### ERYTHEMES ET ESCARRES :

Pas d'érythème	0
Léger érythème à peine visible	1
Erythème bien visible	2
Erythème important	3
Erythème grave avec ou sans escarre	4

### FORMATION D'OEDEME :

Pas d'œdème	0
Très léger œdème à peine visible	1
Léger œdème	2
Oedème moyen (1mm)	3

Oedème grave supérieur à 1mm surface supérieure à la zone d'application 4

Cette méthode ne peut s'appliquer qu'aux produits ne colorant pas la peau de manière indélébile.

Dans le cas contraire, une biopsie devra être faite, suivie d'un examen histologique.

## A - INTERPRETATION DES RESULTATS

En fonction des moyennes calculées pour chaque animal, des réactions desquamative, de sécheresse, de nécroses ou de corrosion, le pouvoir irritant du produit sera évalué.

## B - EVALUATION DE L'ETAT DE LA PEAU A 72 HEURES

L'évaluation de l'état de la peau est réalisée selon les deux échelles suivantes :

### DESQUAMATION

pas de desquamation	0
desquamation modérée	1
desquamation franche	2
desquamation importante	3

### SOUPLESSE MESUREE PAR EVALUATION DU RETOUR A LA NORMALE APRES PINCEMENT :

retour à la normale	0
léger ralentissement du retour à la normale	1
ralentissement important du retour à la normale	2
pas de retour à la normale	3

NECROSE LOCALE : cotée de 0 à 3

CORROSION cotée de 0 à 3

## 7 - RAPPORT

Le rapport d'expérimentation, rédigé en français, comprend toutes les données individuelles, les résultats des calculs, l'interprétation, le résumé et la conclusion de l'étude.

## 8 - ASSURANCE QUALITE

L'assurance qualité s'assure que les procédures de travail relatives à ce type d'étude sont rigoureusement suivies, par des inspections périodiques réalisées au hasard, au cours de l'année.

Les données figurant dans le rapport d'expérimentation sont auditées par l'Assurance Qualité, conformément aux procédures en vigueur dans le centre.

**EVALUATION IN VITRO DANS UN MODELE PHYSIQUE (RPE)  
DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE D'UN PRODUIT A L'ESSAI**

**APPELE « 96, Vitaliseur Bio Best »**

**Rapport d'étude n° PR5436-2/VT1499/RF1 - Protocole n° 5436-2 - Test référence : E98**

## **INTRODUCTION**

Le commanditaire dispose d'un produit à l'essai appelé «96, Vitaliseur Bio Best ». Il a émis l'hypothèse que ce produit avait une activité anti-oxydante.

En absence d'hypothèse formulée par le commanditaire sur le(s) mécanisme(s) d'action du produit, notre système d'essai standard pour ce type d'étude, le modèle physique DPPH en résonance paramagnétique de l'électron (RPE), a été retenu. L'essai a été réalisé sans précisions sur le degré attendu des modifications des paramètres étudiés, le protocole n'a donc pas été ajusté en fonction de la variabilité expérimentale constatée pour le test retenu dans les valeurs historiques du laboratoire.

L'activité anti-oxydante du produit à l'essai a été évaluée grâce aux propriétés physiques de la sonde DPPH<sup>1</sup> (1,1-diphényl-2-

picrylhydrazyl) mises en évidence par résonance paramagnétique de l'électron (RPE)<sup>2</sup>. La sonde DPPH est un radical dont le spectre RPE est modifié en présence de molécule anti-oxydantes. La RPE permet de caractériser les états de spin (c'est à dire les niveaux d'excitation) des électrons célibataires des molécules. Ces électrons célibataires existent en particulier dans les molécules excitées tels que les radicaux libres.

Le produit à l'essai a été testé pour sa capacité modifier le signal RPE de la sonde DPPH. L' $\alpha$ -D-tocophérol (vitamine E) a été utilisé comme produit de référence.

## **MATERIELS ET METHODES**

### *Produit à l'essai*

Produit : « 96, Vitaliseur Bio Best »

Expéditeur : ECOSYSTEM

Réception : 27 novembre 2000

Conservation chez BIOPREDIC : à 4°C jusqu'au moment de son utilisation

Elimination par BIOPREDIC dans les conditions

contractuelles standards, à savoir 6 mois après envoi du

rapport final, sauf instructions écrites contraires du

commanditaire

<sup>1</sup> Chen C, Tang HR, Sutcliffe LH, Belton PS. Green Tea Polyphenols React with 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Free Radicals in the Bilayer of Liposomes: Direct Evidence from Electron Spin Resonance Studies. J Agric Food Chem (2000) 48:5710-5714.

<sup>2</sup> Rosen GM and Rauckman EJ. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. In "Methods in Enzymology », Packer L., ed., (1984) 105:198-209. Chen C, Tang HR, Sutcliffe LH, Belton PS. Green Tea Polyphenols React with 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Free Radicals in the Bilayer of Liposomes: Direct Evidence from Electron Spin Resonance Studies. J Agric Food Chem (2000) 48:5710-5714.

### **Réactifs**

1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) : SIGMA

$\alpha$ -D-tocophérol (vitamine E) : SIGMA

### **Préparation du produit à l'essai et du produit de référence**

$\alpha$ -D-tocophérol solubilisé dans l'acétone ; testé à 0,25 ; 0,5

et  $1.10^{-4}$  M

« 96, Vitaliseur Bio Best » solubilisé dans l'acétone ; testé

25 ; 37,5 et 50% (v/v)

### **Protocole d'incubation**

Système réactionnel : produit à l'essai ou produit de

référence incubés avec la sonde DPPH.

Temps d'incubation : 3 min

Température d'incubation : température ambiante

Témoin sans produit : correspondant au DPPH + acétone

Replicate : 3

### **Evaluation des effets**

Mesures RPE : effectuées avec un spectromètre

(BRUCKER ESP 300E), à température ambiante

Cavité rectangulaire opérant vers 9,8 GHz avec

modulation du champ magnétique de 100 kHz

Paramètres d'enregistrement des spectres : puissance (mW)

= 4 ; largeur de balayage (Gauss) = 100 ; modulation

(Gauss) = 1,97 ; temps d'acquisition (s) = 5,24 ; constante

de temps (ms) = 10,24 ; gain (dB) = 17 ; nombre de

balayage = 2

### **Traitement des données**

Résultats exprimés en unités arbitraires d'intensité de

signal RPE et en pourcentage d'inhibition par rapport au

groupe 'témoin sans produit'

Tests statistiques effectués sur les valeurs en unités

arbitraires d'intensité de signal RPE

Test de la différence entre les moyennes des différents

groupes par analyse de la variance à un facteur (ANOVA

1 ;  $\alpha < 0,10$ ) : groupe 'témoin sans produit' et groupe

'produit de référence', d'une part, et groupe 'témoin sans

produit' et groupes 'produit à l'essai', d'autre part

Comparaison de la moyenne de chaque groupe traité à

celle du groupe 'témoin sans produit' : test de Dunnett ( $\alpha$

$< 0,10$ )

## **RESULTATS**

L' $\alpha$ -D-tocophérol, utilisé comme produit de référence, testé à 0,25 ; 0,5 et  $1.10^{-4}$ M, diminuait significativement le signal RPE de la sonde DPPH de 21,6% ( $p < 0,01$ ), 48,1% ( $p < 0,01$ ) et 85,5% ( $p < 0,01$ ), respectivement. Ce résultat était attendu et validait le test.

« 96, Vitaliseur Bio Best », testé à 25 ; 37,5 et 50% (v/v), diminuait significativement le signal RPE de la sonde DPPH de 12,5% ( $p < 0,01$ ), 73,1% ( $p < 0,01$ ) et 81,6% ( $p < 0,01$ ), respectivement.

En **conclusion**, dans les conditions expérimentales retenues, « 96, Vitaliseur Bio Best » avait des propriétés antioxydantes. A la concentration 50%, « 96, antioxydant nouvelle génération » avait le même pouvoir antioxydant que l' $\alpha$ -D-tocophérol (vitamine E) à la concentration de  $100\mu\text{M}$  (=  $43\mu\text{g/ml}$ ).

# TABLEAUX

## Effet anti-oxydant de l' $\alpha$ -D-tocophérol et de « 96, Vitaliseur Bio Best »

	Témoin				
Bruit de fond	0.226				
Signal	2,866	2,936	2,979	2,954	2,871
	2,762	2,815	2,910	2,816	2,885
	2,754	2,848	2,826	2,939	2,811
<b>Moyenne</b>	<b>2,865</b>				
Ecart-type	0,069				
<b>%Inhibition</b>	<b>0%</b>				

	$\alpha$ -D-tocophérol		
	0,25.10 <sup>-4</sup> M	0,5.10 <sup>-4</sup> M	1.10 <sup>-4</sup> M
Signal	2,241	1,520	0,616
	2,342	1,666	0,617
	2,304	1,598	0,591
<b>Moyenne</b>	<b>2,296***</b>	<b>1,595***</b>	<b>0,608***</b>
Ecart-type	0,051	0,073	0,015
<b>%Inhibition</b>	<b>21,6%</b>	<b>48,1%</b>	<b>85,5%</b>

	« 96, antioxydant nouvelle génération »		
	25 %	37,5%	50%
Signal	2,381	0,906	0,693
	2,656	0,949	0,764
	2,565	0,950	0,681
<b>Moyenne</b>	<b>2,534***</b>	<b>0,935***</b>	<b>0,713***</b>
Ecart-type	0,140	0,025	0,045
<b>%Inhibition</b>	<b>12,5%</b>	<b>73,1%</b>	<b>81,6%</b>

\*\*\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin, p<0,01

\*\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin, p<0,05

\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin, p<0,1

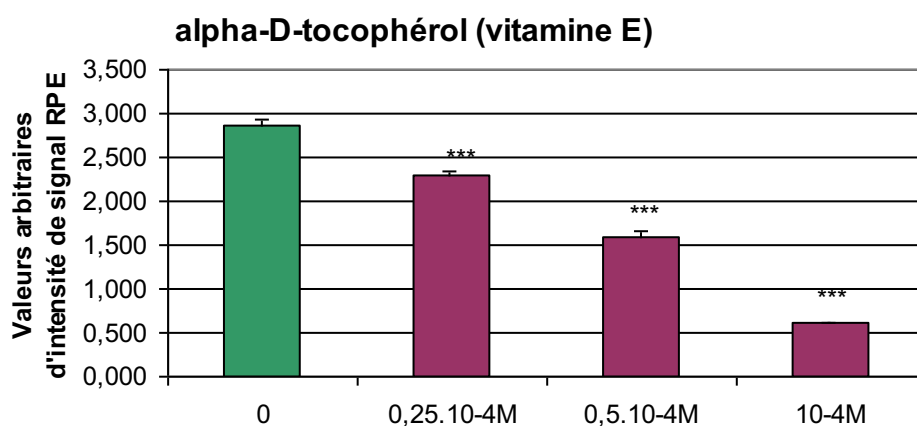
# FIGURES

## Effet anti-oxydant de l' $\alpha$ -D-tocophérol

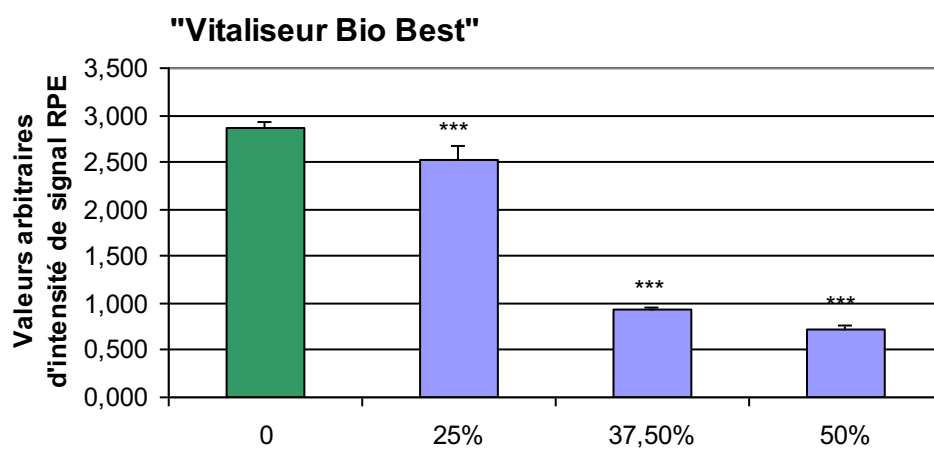
\*\*\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin, p<0,01

\*\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin, p<0,05

\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin, p<0,1



*Effet anti-oxydant de « 96, Vitaliseur Bio Best»*



\*\*\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin,  $p < 0,01$

\*\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin,  $p < 0,05$

\* = moyenne significativement différente de celle du groupe témoin,  $p < 0,1$