

APPENDIX 10

EVIC CEBA REPORTS

Acute toxicity

Skin irritation

Skin Sensitization



Réf. : J 773/1079

LABORATOIRES DERIVES RESINIQUES
ET TERPENIQUES

RECHERCHE DE LA TOXICITE AIGUE
PAR VOIE ORALE CHEZ LE RAT

DU PRODUIT
ACUTE ORAL TOXICITY-IN RATS OF
BETA SITOSTEROL

Blanquefort, le 28 Février 1990

BLANQUEFORT - FRANCE
X 550 717 - FAX (33) 56 95 05 22
(33) 56 35 02 25

1, rue Messue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

AU CAPITAL DE 2 400 000 FRF - RC 708 70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 000 16

773001

Réf. : J 773/1079

ORAL ACUTE TOXICITY TEST
RECHERCHE DE LA TOXICITE AIGUE PAR VOIE ORALE
CHEZ LE RAT
IN RAT

STUDY REFERENCE :

Référence de l'étude :

- Toxicité aiguë : J 773/1079
Acute Toxicity

Protocole utilisé :

Protocol used

- Toxicité aiguë : OCDE 401 (épreuve limite à 2 g/kg)
Acute Toxicity OECD 401 (test limit at 2 g/kg)

Produit étudié : BETA SITOSTEROL

Studied product

Résultats :

Results

- Toxicité aiguë : absence de mortalité à la dose de 2 g/kg
(5 ml/kg)
Acute Toxicity : Absence of any mortality at the dosage of 2 g/kg

Responsable de projet : J.M. CHARRIER

Project manager

Directeur de l'étude : P. REDON

Director of the study

Responsable Assurance Qualité : Marie-Laure MIGNAUD

Responsible for Quality Insurance

Directeur du Centre d'essais : Ph. MASSON

Manager of the Center

Dates d'essai :

Dates of testing

- Toxicité aiguë : du 21.02.90 au 7.03.90
Acute toxicity

Accréditation RNE n° 29-85/1/26

L'accréditation RNE atteste uniquement de la compétence technique
du laboratoire pour les essais couverts par l'accréditation.

I - PRODUIT ETUDIE -

- Date de réception : 19.02.90
- Nom du produit : BETA SITOSTEROL
- Quantité reçue et conditionnement : 250 g
1 flacon en verre
- Caractéristiques organoleptiques : poudre blanche
- Référence d'enregistrement : 1079
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière
- Archivage : environ 5 g - conservés 10 ans

II - REACTIF EXPERIMENTAL -

- 5 rats mâles traités et 5 rats mâles témoins
IOPS de souche OFA SD
- Origine : IFFA CREDO installé à 69210 L'ARBRESLE
- Poids moyens en début d'étude :
 - témoins : 214,8 g
 - traités : 220,0 g
- Conditions de stabulation : 5 par cage, dans des conditions conformes aux exigences de la directive 86/609/CEE.

III - CONDITIONS D'UTILISATION DU PRODUIT -

Le produit a été utilisé dilué à 50 % (p/v) dans l'huile de vaseline (soit 5 g de produit dans 10 ml de véhicule). Il a été administré par sondage oesophagien à raison de 2 g/kg (5 ml/kg de la préparation) à des rats ayant subi une diète hydrique préalable de 18 heures.

Ils ont été observés pendant 14 jours consécutifs après traitement.

Un examen autopsique a été pratiqué après 14 jours.

IV - RESULTATS - RESULTS

IV.1. Mortalité

Aucun décès n'a été enregistré au cours des 14 jours d'observation qui ont suivi l'administration orale de la préparation.

No mortality has been registered after 14 days of absorption of the preparation.

IV.2. Observations cliniques

Aucune modification significative du comportement n'a été constatée immédiatement après le traitement.

Cependant, 20 minutes plus tard, une légère piloérection a été notée chez tous les animaux des deux lots.

Les examens quotidiens renouvelés pendant les 14 jours consécutifs suivants n'ont permis de noter aucune altération de l'état général, du comportement et des fonctions végétatives des animaux traités.

L'évolution pondérale a dans l'ensemble été normale et satisfaisante.

Le gain pondéral moyen des rats du lot 1 est apparu légèrement plus faible que celui des rats témoins (en raison de quelques involutions observées chez 3 animaux à J14).

Aucune lésion organique ou tissulaire n'a été relevée à l'autopsie.

Chemical observation :

No significant modification of behaviour.

No alteration of the general state of animals.

Normal weight evolution after 14 days.

No organic or tissular lesion observed during autopsy.

TABLEAU / TABLE : I

N° Etude / Study No		Voie d'Administration : ORALE Administration by Oral Route					
J/DW = 21.02.90		Espèce : R A T Species : R A T		Sexe : Mâle et Femelle Sex : Male and Female			
EVOLUTION PONDERALE CHANGES IN WEIGHT (Grammes)							
LOTS / GROUPS		J-1 D-1	J 0 D 0	J 3 D 3	J 7 D 7	J 14 D 14	J-1, J 14 D-1, D 14
M 0	Mean = S.D =	232.4 5.0	214.3 5.4	263.2 7.2	300.2 11.9	317.0 18.2	84.6 14.9
M 1	Mean = S.D =	238.8 3.8	230.0 3.1	265.6 8.4	276.0 10.7	294.0 15.1	55.2 12.3
Analyse statistique des moyennes. / Statistic analyse of the means.							
VARIANCES :							
Moy.² M0		34.3	29.7	53.7	141.2	332.5	221.3
Moy.² M1		14.2	9.5	70.8	114.0	239.5	151.7
Test F :							
M0/M1 ou M1/M0		2.4	3.1	1.3	1.2	1.5	1.5
		nA = 5 ; nB = 5 ; p = 7,15					
Si F < 7.15 test T classique :							
t0t1 Male		2.0	1.9	0.5	0.6	2.1	3.2
d.d.1 : Male/Femelle		8	8	8	8	8	8
Si f > 7.15 test T corrigé :							
t0t1 Male		2.1	1.9	0.5	0.6	2.2	3.4
Male d.d.1 =		7	6	8	8	8	8
Calcul de l'estimation de la variance commune							
Male S² =		26.0	30.8	71.1	141.8	309.1	205.5
INTERPRETATION DES RESULTATS :							
Mâles / Males		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	*

773005

A N N E X E S

773004

Annexe / Appendix : I.Ma

COIN / CONTROL DOSE : 5 ml/Kg d'Huile de Vaseline (PD) LOT #
 DOSE : 5 ml/Kg of Vaseline Oil (PD) GROUP #
 N° : 21.02.90 Espèce : RAT Sexe : Mâle Opérat. : C.T.
 Species : RAT Sex : Male

an N°	EVOLUTION PONDERALE CHANGES IN WEIGHT (Grammes)						EXAMEN AUTOPSIQUE POST-MORTEM EXAMINATION	
	J-1 D-1	J 0 D 0	J 3 D 3	J 7 D 7	J 14 D 14	J-1, J 14 D-1, D 14	Cause/Date mortalité	OBSERVATIONS des ORGANES
497	240	216	275	311	330	90	T-J/D14	R.A.S - N.A.D
498	224	206	260	290	305	81	T-J/D14	R.A.S - N.A.D
499	232	215	256	298	315	83	T-J/D14	R.A.S - N.A.D
500	231	216	260	288	295	64	T-J/D14	R.A.S - N.A.D
501	235	221	265	314	340	105	T-J/D14	R.A.S - N.A.D
MO) =	5	5	5	5	5	5	LEGENDE / LEGEND	
pan =	232,4	214,8	263,2	300,2	317,0	84,6	! T : Sacrifice / Sacrifice	
S.D =	5,9	5,4	7,3	11,9	18,2	14,9	! E : Erreur V. / Bad admin.	
							! S : Spontanée / Natural	
							! A : Accidentelle / Accidental	

773007

Annexe / Appendix : I.Mb

N° Etude J 772 / 1079 DOSE : 2 g/Kg de produit (PO) LDT 1
 / Study N° DOSE : 2 g/Kg of Product (PO) GROUP 1
 J/D0 : 21.02.90 Espèce : RAT Sexe : Mâle
 Species : RAT Sex : Male Opérat. : C.1

N° an Als N°	E V O L U T I O N P O N D E R A L E C H A N G E S I N W E I G H T (Grammes)						E X A M E N A U T O P S I Q U E P O S T - M O R T E M E X A M I N A T I O N	
	J-1 D-1	J 0 D 0	J 3 D 3	J 7 D 7	J 14 D 14	J-1.J 14 D-1.D 14	Cause/Date mortalité	OBSERVATIONS des ORGANES
4492	243	222	277	311	320	77	T-J/D14	R.A.S - N.A.T
4493	239	220	270	297	287	48	T-J/D14	R.A.S - N.A.T
4494	241	224	261	294	292	51	T-J/D14	R.A.S - N.A.T
4495	238	217	265	297	290	52	T-J/D14	R.A.S - N.A.T
4496	233	217	255	291	281	48	T-J/D14	R.A.S - N.A.T
n(M1) =	5	5	5	5	5	5	LEGENDE / LEGEND	
Mean =	238,8	220,0	265,6	296,0	294,0	55,2	! T : Sacrifice / Sacrific	
S.D =	3,8	3,1	8,4	10,7	15,1	12,3	! E : Erreur V. / Bad adm	
							! S : Spontanée / Natural	
							! A : Accidentelle / Accident	

ANNEXE A

I.1. Stabulation

Les rats ont été logés par 5 en bacs de polypropylène de dimensions 46,5 x 31,0 x 19,0 cm, équipés en sciure dépoussiérée (Litalabo) et fermés par un couvercle en acier inoxydable pourvu d'une mangeoire de 869 cm³ et de deux biberons de 500 ml.

Chaque bac était muni d'un porte-étiquette sur lequel était indiqué le numéro de référence de l'étude, le lot auquel appartiennent les animaux, leur numéro de code, leur sexe et la date du traitement.

Pendant toute la durée de l'expérimentation, les rats ont été entretenus dans un local spécifique de dimensions : 5 m x 4 m x 2,50 m, situé dans une zone protégée dont la température = $21^{\circ}\text{C} \pm 2$, l'humidité = $55\% \pm 15$ et le renouvellement d'air (air filtré à 0,6 μm) au minimum de 10 volumes/heure, sont contrôlés à l'aide d'un thermo hygrographe. Le nycthémère est également maintenu en permanence dans le rapport 12/12. Tous les accès sont soumis à des barrières de stérilité : autoclave à double porte et sas hydraulique pour le matériel et vestiaire de décontamination pour le personnel qui revêt chaque jour un équipement stérile comprenant une combinaison, un masque filtrant, une cagoule et des bottes.

I.2. Entretien

Les cages sont changées chaque semaine. Elles sont au préalable lavées puis désinfectées par trempage dans une solution chlorée (Sanachlor) puis rincées à l'eau claire.

Les biberons sont remplacés tous les deux jours. Ils sont décontaminés dans les mêmes conditions que les cobayes avant l'emploi.

Le matériel fixe (chariots, tables, sièges, portoirs) est lavé tous les deux jours à l'eau chlorée (Sanachlor ILM Research).

Les sols sont lavés chaque jour à l'eau chlorée.

Le produit à tester est introduit dans des conditionnements dont la paroi externe a été stérilisée par contact avec une solution de Tego 51 (IFFA CREDO).

1.3. Boisson et alimentation

L'eau de boisson, fournie à volonté, est de l'eau de ville préalablement acidifiée à $\text{pH } 3,5 \pm 0,2$.

L'aliment donné ad libitum est du granulé UAR A 04 - 10.

ANNEXE B

II.1. Traitement

II.1.1. Mode d'administration

Les rats ont été traités par voie orale à l'aide de seringues à usage unique de 5 ou 10 ml graduées au 1/10e (TERUMO), munies d'une sonde œsophagienne de 2 mm de diamètre et de 6 cm de long en acier inoxydable (CARRIERI, PARIS).

II.1.2. Durée

Le traitement a été effectué le matin sur des animaux ayant subi un jeûne préalable de 18 heures environ afin de réduire l'encombrement gastrique. Après l'administration du produit, un délai de 2 heures a été respecté avant de leur redistribuer la nourriture. Les animaux ont ensuite été observés quotidiennement pendant 14 jours.

II.2. Examens pratiqués

II.2.1. Contrôles cliniques

. Observations cliniques

Une observation clinique des rats a été faite chaque jour de manière à suivre l'évolution du comportement général et des réactions végétatives des animaux. L'observation continue pendant les 2 heures qui ont suivi l'ingestion a été renouvelée chaque jour le matin puis en fin de journée pour éviter la lyse des animaux qui auraient pu décéder.

. Pesée individuelle

Elle a été réalisée avant le traitement à J(-1) puis après 3, 7 et 14 jours d'observation.

Les gains de poids qui ont été constatés entre J0 et J14 ont été comparés à ceux obtenus dans le même temps par le lot témoin.

773011

II.2.2. Examen post mortem

Au terme des 14 jours d'observation, les rats ont été sacrifiés par anesthésie barbiturique dépassée suivie d'une exsanguination fémorale.

Chaque animal fait l'objet d'une autopsie soignée permettant d'apprécier l'existence d'éventuels signes d'intolérance générale.



EVIC-CEBA

LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION



*Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous
le numéro 29.85/1/26*

Réf. : J 428/0405

LES DERIVES RESINIQUES ET TERPENIQUES

EVALUATION DE L'IRRITATION CUTANÉE

BETA - SITOSTEROL

Blanquefort, le 18 Décembre 1989

11 - BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX (33) 56 85 05 22
TÉL. (33) 56 35 02 25

1, rue Messue - 94200 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2.400.000 FR. - RC 70810 BORDEAUX - SIRET 420 201 200 10

EVIC-TOX EVIC-DOC EVIC-BIO EVIC-DEC

428001

EVALUATION DE L'IRRITATION ET/OU DE LA CORROSION CUTANÉES
CHEZ LE LAPIN

Références de l'étude :

- Irritation primaire cutanée : J 428/0405

Protocoles utilisés :

- Irritation primaire cutanée : OCDE 404 (3 lapins)

Donneur d'ordre : 410209

Produit étudié : BETA - SITOSTEROL

Résultats :

- Irritation primaire cutanée : produit non irritant

Responsable de projet : J.M. CHARRIER *P.O. Guin*

Directeur de l'étude : Ph. CATROUX *Ph. Catroux*

Assurance Qualité : M.L. MIGNAUD *M. L. Mignaud*

Directeur du Centre d'essais : Ph. MASSON *Ph. Masson*

Dates d'essai :

- Irritation primaire cutanée : du 23.10.89 au 27.10.89

Accréditation RNE n° 29-85/1/26

L'accréditation RNE atteste uniquement de la compétence technique
du laboratoire pour les essais couverts par l'accréditation.

I - PRODUIT ETUDIE -

- Laboratoire demandeur : 410209
- Date de réception : 16.10.89
- Nom du produit : BETA - SITOSTEROL
- Quantité reçue et conditionnement : 1 flacon en verre
(contenance 60 ml)
- Caractéristiques organoleptiques : poudre blanche
- Référence d'enregistrement : 0405
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière
- Archivage : environ 5 ml - conservés 10 ans

II - REACTIF EXPERIMENTAL -

II.1. Irritation primaire

- 3 lapins mâles Néo-zélandais
- Origine : COB.LABO.LAP installé à 22120 IFFINIAC
- Poids en début d'étude : 2,3 à 2,5 kg
- Conditions de stabulation : en cage individuelle sur grille, dans des conditions conformes aux exigences de la directive 86/609/CEE.