

CONFORMITE AUX BPL
selon la directive 2004/10/CE & la
décision du conseil OCDE C(81)30
Décision ANSM 11/12/12
ACCORDING TO GLP
described in the directive 2004/10/CE &
C(81)30 council decision OECD
By ANSM 11/12/12

Elément d'essai / Test item

CREME MERVEILLEUSE - REF : CODE LABO :
CTG130696/0 - CODE PRODUIT : FL4CR0525

Evaluation du potentiel irritant oculaire d'un élément d'essai par application sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf de poule (HET-CAM)

*Evaluation of a test item ocular irritant potential by application
onto the hen egg chorio-allantoic membrane (HET-CAM)*

RAPPORT FINAL / FINAL REPORT

- ❖ Etude n°/Study # : 6.02-17139-ID-13/03097
- ❖ Date du rapport/Report date : 11/06/2013

Donneur d'Ordre
Sponsor

FAREVACARE
1, rue des Sources
77176 SAVIGNY LE TEMPLE
FRANCE

Installation d'Essai
Test Facility

IDEA Lab
Site Montesquieu
Rue Jacques Monod
33650 MARTILLAC
FRANCE

Groupe IDEA TESTS - IDEA Lab

www.ideatest.fr • idea@ideatest.fr

SARL au capital de 10 000 € • RCS BORDEAUX 353 989 684 • APE 7120B • TVA FR 66 353 989 684

101577

Site Martillac : Technopôle Montesquieu 5, rue Jacques Monod CS 60077 33652 MARTILLAC CEDEX • Tél. 05 56 64 82 33 • Fax. 05 56 64 82 11
Site Brest : Technopôle Brest-Iroise 90, rue René Descartes 29280 PLOUZANE • Tél. 02 98 05 19 70 • Fax. 02 98 05 09 73

SOMMAIRE / CONTENTS

Attestation de conformité aux BPL / <i>GLP conformity statement</i>	3
Attestation de l'Assurance Qualité / <i>Quality Assurance statement</i>	4
Présentation de l'étude / <i>Study presentation</i>	5
1. Objectif de l'étude / <i>Study objective</i>	5
2. Élément d'essai / <i>Test item</i>	5
3. Principe de l'étude / <i>Study principle</i>	5
4. Déroulement de l'étude / <i>Study course</i>	6
5. Expression et interprétation des résultats / <i>Results calculation and interpretation</i>	8
6. Déviations et amendements au plan d'étude / <i>Study plan deviations and amendments</i>	9
7. Résultats (cf. Tableau de résultats) / <i>Results (see the results table)</i>	10
8. Conclusion / <i>Conclusion</i>	10
9. Archive / <i>Archive</i>	10
Tableau de résultats / <i>Results table</i>	11

Attestation de conformité aux BPL / *GLP conformity statement*

En accord avec les principes des Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) en vigueur en France, la Directive Européenne 2004/10/CE, l'arrêté du 10 août 2004 du JOFR je déclare que :

- l'étude 6.02-17139-ID-13/03097 a été réalisée selon les principes des BPL dans le laboratoire de la société IDEA Lab,
- le plan d'étude et ses modifications ont été réalisés sous ma responsabilité,
- tous les Modes Opératoires Normalisés ont été suivis,
- les données brutes ont été précisément enregistrées,
- par soucis de confidentialité la formule de l'élément d'essai n'est pas présentée dans ce rapport. Ceci constitue une déviation aux BPL. Cependant, cette formule a été fournie par le Donneur d'Ordre et le Directeur d'Etude en a pris connaissance. Celle-ci est conservée dans un environnement sécurisé conformément aux procédures de la société,
- l'étude a été supervisée par Frédéric NUNZI, Docteur en Biologie Cellulaire et Microbiologie, Directeur d'Installation d'Essai d'IDEA Lab.

Ce rapport reflète précisément l'étude menée ainsi que les résultats obtenus.

Pour ces raisons, le Directeur d'Etude assume la responsabilité de la validité des données de cette étude.

In agreement with the French Good Laboratory Practice (GLP) principles, the European Directive 2004/10/CE, the decree dated August 10th, 2004 from the JOFR, I state that:

- *the study 6.02-17139-ID-13/03097 was performed according to the GLP principles in IDEA Lab company laboratory,*
- *the study plan and its modifications have been performed under my responsibility,*
- *all relevant Standard Operating Procedures have been followed,*
- *raw data have been registered accurately,*
- *for confidentiality concerns the formula of the test item is not shown in this report. This is a deviation to GLP. However, this formula had been provided by the Sponsor and the Study Director has reviewed it. It is kept in a secure environment in accordance with the company procedures,*
- *the study was supervised by Frédéric NUNZI, Doctor in Cell Biology and Microbiology, Test Facility Manager of IDEA Lab.*

This report accurately reflects the study carried out and the results obtained.

For these reasons the Study Director acknowledges responsibility for the data validity of the study.

Date / Date :

12 JUIN 2013

Directeur d'Etude / *Study Director*
Technicienne supérieure de biochimie
High level technician in biochemistry
Dominique OSTINET



Attestation de l'Assurance Qualité / *Quality Assurance statement*

Conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire, je déclare que :

- Le plan d'étude, composé d'un plan d'étude général et d'un plan d'étude spécifique, a été vérifié par l'Assurance Qualité avant le début de l'étude.
- Les différentes phases techniques de l'étude 6.02 sont régulièrement auditées par l'Assurance Qualité. La fréquence de ces audits est définie dans la procédure correspondante.

Lors du dernier audit technique, les activités suivantes ont été inspectées :

- Préparation de l'œuf
 - Contact avec la membrane chorio-allantoïdienne
 - Procédure de lecture
 - Contrôle des données
- Le rapport final a été audité par l'Assurance Qualité d'IDEA Lab. Il reflète avec exactitude les données brutes de l'étude, ainsi que l'application des Modes Opératoires Normalisés et du plan d'étude.

According to the Good Laboratory Practices, I state that:

- *The study plan, consists of a general study plan and a specific study plan was verified by the Quality Assurance before the beginning of the study.*
- *The different technical phases of the study 6.02 are regularly audited by the Quality Assurance. The audit frequency is defined in the corresponding procedure.*

At the last technical audit, the following activities have been inspected:

- *Egg preparation*
 - *Contact with chorioallantoic membrane*
 - *Reading procedure*
 - *Control of the raw data*
- *The final report was audited by the Quality Assurance of IDEA Lab. It accurately reflects the raw data from the study and the application of the Standard Operating Procedures and the study plan.*

Nature de l'audit <i>Audit nature</i>	Dates d'audits <i>Audits dates</i>	Dates de transmission du rapport d'audit au Directeur d'Etude et à la Direction <i>Transmission dates of the audit report to the Study Director and the General Management</i>
Phases techniques de l'étude <i>Technical phases of the study</i>	11/03/2013	25/03/2013
Plan d'Etude Général <i>General Study Plan</i>	02/01/2013	02/01/2013
Rapport Final <i>Final Report</i>	12 JUIN 2013	12 JUIN 2013

Date / Date :

12 JUIN 2013



Assurance Qualité / *Quality Assurance*

Présentation de l'étude / *Study presentation*

1. Objectif de l'étude / *Study objective*

A la demande du Donneur d'Ordre, nous avons évalué la tolérance oculaire d'un élément d'essai par la méthode du HET-CAM selon le plan d'étude général 6.02.

At the Sponsor's request, we have evaluated the eye tolerance of a test item according to the general study plan HET-CAM method.

2. Elément d'essai / *Test item*

Dénomination / <i>Name</i>	: CREME MERVEILLEUSE - REF : CODE LABO : CTG130696/0 - CODE PRODUIT : FL4CR0525
Code interne / <i>Internal code</i>	: ID-13/03097
Numéro de lot / <i>Batch number</i>	: I2001
Présentation / <i>Aspect</i>	: Emulsion / <i>Emulsion</i>
Couleur / <i>Color</i>	: Blanc / <i>White</i>
Conditions de stockage / <i>Storage conditions</i>	: Température ambiante / <i>Room temperature</i>
Nature de l'élément d'essai / <i>Test item nature</i>	: Produit fini cosmétique / <i>Finished cosmetic product</i>
Classe de l'élément d'essai / <i>Test item class</i>	: Soins / <i>Care</i>
Site d'application / <i>Application site</i>	: Contour des yeux / <i>The eye contour</i>
Conditions d'utilisation / <i>Use conditions</i>	: Pur non rincé / <i>Pure non rinsed</i>
Date de péremption* / <i>Expiry date*</i>	: 01/08/2013

* Dans le cas où la date de péremption de l'élément d'essai testé n'a pas été fournie précisément par le Donneur d'Ordre (> X mois), celle-ci sera définie arbitrairement par nos soins comme le jour correspondant à X mois à compter de la date de fabrication.

** If the expiry date of the assessed test item was not precisely provided by the Sponsor (> X months), this one will be arbitrarily defined by us as the day corresponding to X months as from the date of manufacture.*

Les données relatives à l'identité, à la pureté et à la stabilité de l'élément d'essai sont sous la responsabilité du donneur d'ordre. La fiche technique de l'élément d'essai a été fournie par le Donneur d'Ordre.

Information linked to the identification, purity and stability of the test item are under the responsibility of the sponsor of the study. The technical data sheet of the test item was provided by the Sponsor of the study.

3. Principe de l'étude / *Study principle*

Ce test est une méthode alternative pour l'évaluation du potentiel irritant d'un élément d'essai.

Le principe a pour base l'observation des effets irritants (hyperémie, hémorragie, coagulation) pouvant survenir dans les cinq minutes après le dépôt d'un élément d'essai sur la membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'un œuf de poule embryonné, au dixième jour d'incubation. En fonction de la présence de ces phénomènes et de leur temps d'apparition un score est établi.

La moyenne des scores obtenus sur 4 œufs permet de noter le produit et de le classer selon son potentiel irritant.

Cette étude est réalisée d'après le protocole interne 6.02 adapté du Journal Officiel de la République Française (N°300) du 26 décembre 1996.

This is an alternative method to evaluate the irritant potential of test item.

The principle is based on the observation of the irritant effects (hyperaemia, haemorrhage, coagulation) which may occur within five minutes after placing a test item onto the chorio-allantoic membrane (CAM) of an embryonic hen egg on the tenth day of incubation.

A score is established from the presence (or absence) of these effects and the time when they appear. The mean score obtained from four eggs is used to classify the substance into four categories of irritant potential.

This study is conducted in accordance with the internal protocol 6.02 adapted from Official Journal of the Republic of France (#300) dated 26 December 1996.

4. Déroulement de l'étude / Study course

Dates de l'expérimentation / Experimentation dates :

L'expérimentation a été réalisée le 23/05/2013.

The experimentation was carried out on 23/05/2013.

Système d'essai / Test system :

Œuf de poule embryonné (souche White Leghorn) d'un poids de 50 à 65 g à réception.

Fertilized hen egg (White Leghorn strain) weight from 50 to 65 g at receipt.

Matériel et réactifs / Material and reagents :

- Sérum physiologique (NaCl 9 g/l)
- Solution de pentobarbital à 20 mg/ml
- Incubateur à œufs
- Chronomètre
- Pincés coudées, ciseaux pointus
- Tubes, pipettes, seringues
- Bain marie à 37 °C
- Balance de précision

- *Saline solution (NaCl 9 g/l)*
- *20 mg/ml pentobarbital solution*
- *Eggs incubator*
- *Stopwatch*
- *Tweezers, pointed scissors*
- *Tubes, pipettes, syringes*
- *37 °C water bath*
- *Precision weight*

Éléments de référence / Reference items :

- **Contrôle négatif :** solution de Lauryl Sulfo Bétaïne (LSB) - numéro CAS : 14933-08-5 à 0,05 % dans du sérum physiologique
- **Contrôles positifs :** solution de Lauryl Sulfo Bétaïne (LSB) - numéro CAS: 14933-08-5 à 3,2 et 0,4 % dans du sérum physiologique

- *Negative control: Lauryl Sulfo Bétaïne (LSB) - CAS number: 14933-08-5 solution at 0.05 % in saline solution*
- *Positive control: Lauryl Sulfo Bétaïne (LSB) - CAS number: 14933-08-5 solution at 3.2 and 0.4 % in saline solution*

Définition des séries / Series definition :

L'élément d'essai est testé pur sur quatre œufs (300 µl par œuf).

Les éléments de référence sont testés à chaque analyse sur deux œufs (300 µl).

The test item pure is tested on four eggs (300 µl per egg).

The reference items are tested in each analysis on two eggs (300 µl).

Protocole de test / Test protocol :

Les différentes étapes sont enchaînées rapidement sous un éclairage suffisant ne dégageant pas de chaleur afin d'éviter le dessèchement de la MCA (dans le cas contraire maintenir le taux d'humidité par brumisation).

L'œuf est placé verticalement sur un support (poche d'air en haut). La coquille est entaillée au niveau de la poche d'air, puis enlevée jusqu'à la membrane coquillière.

Les œufs ne présentant pas d'embryon de poussin vivant sont éliminés.

La surface dégagée est humidifiée avec le sérum physiologique tiédi à 37 °C. Le sérum physiologique est éliminé par inclinaison de l'œuf.

La membrane coquillière est délicatement décollée avec une pince, puis retirée afin de découvrir la MCA sous jacente.

Un œuf dont la MCA est défectueuse, ou comportant des traces d'hémorragie, sera éliminé.

L'intégrité de la MCA est consignée pour chaque œuf sur la fiche de relevé des scores au moment du test.

300 µl de chaque élément d'essai ou de référence (pur ou dilué) tiédi sont déposés délicatement sur la MCA à l'aide d'une pipette et le chronomètre est déclenché. Au bout de 20 secondes de contact, la membrane est rincée avec 5 ml de sérum physiologique à 37 °C, en évitant toute projection brutale. Le liquide de rinçage est éliminé par inclinaison de l'œuf.

En fin d'essai chaque œuf reçoit une dose létale de 0,2 ml de pentobarbital à 20 mg/ml.

The different stages are performed rapidly under sufficient lighting not emitting heat. Drying of the CAM must be avoided (if drying occurs maintain the humidity level by spraying).

The egg is placed vertically on a support (air pocket upwards).

The shell is cracked at the level of the air pocket and then removed to the level of the shell membrane.

Eggs which do not have a live hen embryo are removed.

The released surface is moistened with saline solution warmed to 37 °C and the solution is removed by tilting the egg.

The shell membrane is delicately detached with tweezers and then removed in order to uncover the underlying CAM. Any egg with a defective CAM or traces of haemorrhage is removed. The MCA integrity is recorded for every egg on scores sheet at the time of the test.

300 µl of the warmed test item (undiluted or diluted) are carefully placed on the CAM with a pipette and the stopwatch is started. After contact for 20 seconds the membrane is rinsed with 5 ml of saline solution at 37 °C avoiding any violent splashing. The rinse liquid is removed by tilting the egg.

At the end of the test, eggs receive a lethal injection of 0.2 ml 20 mg/ml pentobarbital.

Procédure de lecture / Reading procedure :

Les éventuels phénomènes d'irritation sont observés durant 5 minutes. L'intervalle de temps d'apparition de chaque phénomène (hyperémie, hémorragie, coagulation) est relevé selon la loi du tout ou rien (on note la présence et non l'intensité du phénomène).

Hyperémie ou injection : des capillaires non visibles avant l'ajout du produit deviennent visibles, alors que les capillaires déjà visibles se dilatent et deviennent plus rouges. Ce phénomène peut affecter les vaisseaux de diamètres supérieurs.

Hémorragie : libération du sang s'échappant des vaisseaux et/ou des capillaires, pouvant se présenter sous différents aspects, et notamment en « chou-fleur », en nappe, en voile diffus, en piqueté (le sang s'échappe ponctuellement à différents endroits de la membrane).

Il faut noter que :

L'hémorragie peut présenter un caractère éphémère : elle doit être néanmoins prise en compte.

L'observation, dans les 30 premières secondes, d'une hémorragie massive impose la prise en compte de l'hyperémie masquée.

Coagulation (Opacité / Thrombose) :

- Opacité :** voile opalescent ou opacification directe de tout ou partie de la membrane (attention à ce que le phénomène ne soit pas lié au comportement physico-chimique du produit en milieu aqueux, formation d'un colloïde, d'un précipité...).
- Thrombose :** rupture du flux sanguin se traduisant par un aspect segmenté des vaisseaux (alternance d'étranglements et de zones turgescents plus ou moins sombres). Il ne sera pas pris en compte les modifications intervenant au niveau des capillaires.

Any irritant effects are observed for 5 minutes. The time interval when each effect appears (hyperaemia, haemorrhage, coagulation) is recorded by the all or nothing law. The presence and not the severity of the effect is recorded.

Hyperaemia or injection

Capillaries which were invisible before adding the substance become visible whereas capillaries which were already visible dilate and become redder. This phenomenon may affect large diameter vessels.

Haemorrhage

Release of blood escaping from the vessels and or capillaries may take on different appearances, particularly « cauliflower » patches, diffuse sheet, or punctate (the blood escapes intermittently at different places in the membrane).

It must be noted that:

Haemorrhage may take on a transient appearance: this must nevertheless be counted.

Masked hyperaemia must be counted if massive haemorrhage occurs during the first 30 seconds.

Coagulation, opacity and/or thrombosis

Opacity: opalescent sheet or direct opacification of part or all of the membrane (take care that this effect is not due to the physico-chemical properties of the substance in aqueous medium, formation of a colloid or precipitate etc.).

Thrombosis: discontinuation of blood flow producing a segmented appearance of the vessels (alternating areas of strangulation more or less dark turgescence areas). Changes occurring in the capillaries are not counted.

5. Expression et interprétation des résultats / Results calculation and interpretation

Une note d'évaluation est attribuée pour chaque phénomène selon leur délai d'apparition.

Notation en fonction du temps :

Phénomène	Temps		
	T ≤ 30s	30s < T ≤ 2 min	2 < T ≤ 5 min
Hyperémie	5	3	1
Hémorragie	7	5	3
Coagulation, opacité et/ou thrombose	9	7	5

Le score pour chaque œuf est la somme des notes de chaque phénomène. La notation de l'élément d'essai est la moyenne arithmétique, arrondie à deux décimales, des scores obtenus sur tous les oeufs (notation maximum = 21).

La synthèse des résultats est effectuée par une matrice sur le logiciel Excel, validée et verrouillée par un mot de passe.

Le potentiel irritant de l'élément d'essai (pur ou dilué) est donné par l'échelle suivante :

Notation (N)	Classification
$N < 1$	Pratiquement non irritant
$1 \leq N < 5$	Faiblement irritant
$5 \leq N < 9$	Modérément irritant
$N \geq 9$	Irritant

De manière à vérifier la qualité des conditions opératoires et celle de l'expérimentateur, un contrôle sera fait à l'aide des éléments de référence qui doivent être classés de la manière suivante :

Lauryl sulfobétaïne à 0,05 % : Pratiquement non irritant ou Faiblement irritant

Lauryl sulfobétaïne à 0,4 % : Modérément irritant ou Irritant

Lauryl sulfobétaïne à 3,2 % : Irritant

La validation du résultat est réalisée par le Directeur d'Etude en accord avec l'instruction de travail IL 04. Le choix de confirmer le résultat par la même méthode ou par une méthode différente est laissé à l'expertise du Directeur d'Etude.

An evaluation score is assigned to each phenomenon according to its occurrence time:

Scores according to the time:

Effect	Time		
	$T \leq 30s$	$30s < T \leq 2 \text{ min}$	$2 < T \leq 5 \text{ min}$
Hyperaemia	5	3	1
Haemorrhage	7	5	3
Coagulation, opacity and/or thrombosis	9	7	5

The score for each egg is the sum of each phenomenon scores. The test item rating is the arithmetic mean, rounded to two decimal points, of the scores obtained for all eggs (maximum rating 21).

The result synthesis is performed using a matrix on the Excel software, validated and locked by a password.

The test item irritation potential (pure or dilute) is given by the following scale:

Rating (N)	Classification
$N < 1$	Practically non irritant
$1 \leq N < 5$	Slightly irritant
$5 \leq N < 9$	Moderately irritant
$N \geq 9$	Irritant

A control is performed using the reference item in order to confirm the operating conditions quality and experimenters technique. These must be classified as follows:

0.05 % lauryl sulfo betaine: Practically non-irritant or Slightly irritant

0.4 % lauryl sulfo betaine: Moderately irritant or Irritant

3.2 % lauryl sulfo betaine: Irritant

The result validation is performed by the Study Director in agreement with the working instruction IL 04. The choice for the result confirmation with the same method or with an alternative method is under the responsibility of the Study Director.

6. Déviations et amendements au plan d'étude / Study plan deviations and amendments

Amendement au plan d'étude n°1 :

A la demande du Donneur d'Ordre, son nom et son adresse ont été corrigés.

Study plan amendment n°1:

At the Sponsor's request, his name and his address have been corrected.

7. Résultats (cf. Tableau de résultats) / Results (see the results table)

Validation du test / Test validation :

Les résultats trouvés pour les éléments de référence permettent de valider le test (Cf. tableau de résultat).

Results found for the reference items allow to validate the test (Cf result table).

Résultats / Results :

La notation moyenne observée pour l'élément d'essai est égale à 0,00.

Dans les conditions expérimentales retenues, le potentiel irritant de l'élément d'essai **CREME MERVEILLEUSE - REF : CODE LABO : CTG130696/0 - CODE PRODUIT : FL4CR0525 code ID-13/03097** testé pur, peut être classé comme **pratiquement non irritant** d'après le barème adopté.

The mean rate calculated for the test item is 0.00.

*Under the retained experimental conditions, the irritant potential of the test item **CREME MERVEILLEUSE - REF : CODE LABO : CTG130696/0 - CODE PRODUIT : FL4CR0525 code ID-13/03097** pure tested, may be classified as **practically non irritant** according to the adopted scale.*

8. Conclusion / Conclusion

La conclusion est établie en accord avec les données statistiques obtenues à partir des résultats historiques des éléments d'essai de même classe. Elle est laissée à l'appréciation du Directeur d'Etude.

Compte tenu de la catégorie de l'élément d'essai, ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour les éléments d'essai de la même classe.

The conclusion is established in agreement with the statistical data obtained from the historical results of the same class test item. It is under the responsibility of the Study Director.

Taking into account the test item class, these results are similar to those obtained for same class test items.

9. Archive / Archive

La durée totale de conservation du dossier correspondant à l'étude (plan d'étude, rapport, données brutes) est de 10 ans. Ce dossier est conservé au moins 6 mois dans la salle archive d'IDEA Lab sur le site de Martillac et sera susceptible d'être transféré dans les locaux d'une société spécialisée par la suite.

L'élément d'essai sera conservé 6 mois dans la salle produit du site de Martillac avant d'être détruit ou renvoyé au Donneur d'Ordre selon son choix.

Les échantillons des éléments de référence seront conservés 10 ans ou jusqu'à leur date de péremption, dans les conditions de conservation requises (boîtes fermées à clé dans une armoire, un frigo ou un congélateur) sur le site de Martillac.

The total storage of the study folder is 10 years (study plan, report, raw data).

The folder will be stored at least 6 months in the IDEA Lab archive room, on the Martillac location, and would be susceptible to be transferred to the premises of a specialized company.

The test item will be stored 6 months in the product room of the Martillac location before to be destroyed or sent back to the Sponsor according his choice.

The reference item samples will be stored 10 years, or until their expiry date in the required storage condition (locked boxes in cabinet, fridge or freezer) on the Martillac location.

Tableau de résultats / Results table

Expérimentation le 23/05/2013

Experimentation from 23/05/2013

ID-13/03097

Contrôle / Control

Lauryl sulfobétaïne	3,20%	score sur 2 œufs	18
	0,40%	score on 2 eggs	10
	0,05%		0

Dilutions	Œufs Eggs	Phénomène observé / Observed phenomenon	Notation	Score	Moyenne Mean score	Classification
Pur / pure	1	Hyperémie/ <i>Hyperemia</i> Hémorragie/ <i>Hemorrhage</i> Coagulation / <i>Opacity</i>	0 0 0	0	0,00	Pratiquement non irritant / Practically non irritant
	2	Hyperémie/ <i>Hyperemia</i> Hémorragie/ <i>Hemorrhage</i> Coagulation / <i>Opacity</i>	0 0 0	0		
	3	Hyperémie/ <i>Hyperemia</i> Hémorragie/ <i>Hemorrhage</i> Coagulation / <i>Opacity</i>	0 0 0	0		
	4	Hyperémie/ <i>Hyperemia</i> Hémorragie/ <i>Hemorrhage</i> Coagulation / <i>Opacity</i>	0 0 0	0		

