

Elément d'essai / Test item
SOLUTION SALINE

**Evaluation du potentiel irritant oculaire d'un
élément d'essai par l'étude de la cytotoxicité après
diffusion en gel d'agarose sur lignée cellulaire
NCTC L929**

*Evaluation of a test item ocular irritant potential by cytotoxicity
study after diffusion on agarose gel on NCTC L929 cells line*

-
- ❖ Etude n°/Study # : 6.01-A-15100-ID-12/05732
❖ Date du rapport/Report date : 29/01/2013
-

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

SOMMAIRE / CONTENTS

Déclaration de conformité aux BPL / <i>GLP conformity statement</i>	3
Déclaration 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>	8
7. Résultats (cf. Tableau de résultats) / <i>Results (see the results table)</i>	9
8. Conclusion / <i>Conclusion</i>	9
9. Archive / <i>Archive</i>	9
Tableau de résultats / <i>Results table</i>	10

Déclaration 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 6.01-A-15100-ID-12/05732 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 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 6.01-A-15100-ID-12/05732 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 validity of the study.*

Date / Date : 27 FEV. 2013

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



Déclaration 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 démarrage de l'étude.
- Les différentes phases techniques de l'étude 6.01-A 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 :

- Ensemencement des cellules
 - Préparation du milieu complet à 1 % d'agarose
 - Mise en contact des cellules avec le milieu complet à 1 % d'agarose
 - Mise en contact des cellules avec les éléments d'essais et de référence
- 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 protocole.

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 6.01-A 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:

- *Cells seeding*
 - *Supplemented medium preparation at 1 % agarose*
 - *Contact of cells with medium at 1 % agarose*
 - *Contact of cells with test and reference items*
- *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 protocol.*

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>	Du / <i>from</i> 22/08/2012 au / <i>to</i> 24/08/2012	30/08/2012
Plan d'Etude Général <i>General Study Plan</i>	02/01/2013	02/01/2013
Rapport Final <i>Final Report</i>	27 FEV. 2013	27 FEV. 2013

Date / *Date* :

27 FEV. 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, par un test *in vitro*, la tolérance oculaire d'un élément d'essai selon le protocole 6.01-Agarose.

At the Sponsor request, we have evaluated, by an in vitro test, the eye tolerance of a test item according to the protocol 6.01-Agarose.

2. Élément d'essai / *Test item*

Dénomination / <i>Name</i>	: SOLUTION SALINE
Code interne / <i>Internal code</i>	: ID-12/05732
Numéro de lot / <i>Batch number</i>	: 2005
Présentation / <i>Aspect</i>	: Liquide / <i>Liquid</i>
Couleur / <i>Color</i>	: Transparent / <i>Transparent</i>
Conditions de stockage / <i>Storage conditions</i>	: A l'abri de la lumière + température ambiante / <i>Keep away from light + 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>	: Hygiène / <i>Hygiene</i>
Site d'application / <i>Application site</i>	: Corps / <i>Body</i>
Conditions d'utilisation / <i>Use conditions</i>	: Pur non rincé / <i>Pure non rinsed</i>
Date de péremption* / <i>Expiry date*</i>	: 01/10/2013

* 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 qui concourt à l'évaluation du potentiel irritant oculaire d'un élément d'essai.

Le principe a pour base la détermination de la cytotoxicité de l'élément d'essai 24 heures après son application à la surface d'un gel d'agarose en contact avec une monocouche cellulaire.

La plage de lyse cellulaire est révélée par coloration, elle est liée à la capacité de diffusion de l'élément d'essai à travers le gel d'agarose. La mesure du diamètre de la plage de lyse est proportionnelle à la cytotoxicité de l'élément d'essai.

Cette étude est réalisée d'après le protocole proposé au Journal Officiel de la République Française (N° 302) du 30 décembre 1999.

This test is an alternative method which aims to assess a test item eye irritant potential.

The principle is based on the test item cytotoxicity determination 24 hours after its application on an agarose gel which is in contact with a cellular monolayer.

The cellular lysis area is revealed by colouring, it is related to the diffusion capacity of the test item through the agarose gel. The measurement of the diameter of the lysis area is proportional to the test item cytotoxicity.

This investigation is carried out according to the protocol provided in the Journal Officiel de la République Française (# 302) dated December 30th 1999.

4. Déroulement de l'étude / Study course

Dates de l'expérimentation / Experimentation dates :

L'expérimentation a été réalisée du 07/01/2013 au 09/01/2013.

The experimentation was carried out from 07/01/2013 to 09/01/2013.

Système d'essai / Test system :

Cellules : fibroblastes de poumon de souris NCTC L929 (ATCC-CCL1) entretenus selon l'instruction de travail correspondante.

Les cellules sont exemptes de mycoplasmes. Le test de détection des mycoplasmes est réalisé selon l'instruction IL 07.

Les cellules sont utilisées au passage 596.

Cells: murine lung fibroblasts NCTC L929 (ATCC-CCL1) maintained according to the corresponding SOP.

Cells are exempt of mycoplasma. Assessment of mycoplasma is performed according to the internal procedure IL 07.

Cells are used at passage 596.

Matériel et réactifs / Material and reagents :

- Milieux de culture :
 - DMEM 1 g/l de glucose
 - DMEM 1 g/l de glucose complet : DMEM 1 g/l de glucose, 2 mM de L-glutamine ou glutamine stabilisée, 10 % de SVF décomplémenté, 50 UI/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 1 % d'acides aminés non essentiels
 - DMEM concentré 2 fois préparé selon le Mode Opérateur ML 03
 - DMEM concentré 2 fois (2X) complet : DMEM concentré 2 fois, 4 mM de L-glutamine ou glutamine stabilisée, 20 % de SVF décomplémenté, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine
 - PBS de Dubelcco sans Ca²⁺ et Mg²⁺ et sérum physiologique (NaCl 9 g/l)
 - Agarose à faible température de gélification
 - Solution de coloration : solution de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) à 0,5 mg/ml dans le milieu de culture ou Rouge Neutre (colour index 50040) à 0,05 mg/ml dans le milieu de culture
 - Boîtes de pétri pour culture cellulaire diamètre 60 mm
 - Disques de papier filtre diamètre 6 mm
 - Papier millimétré
 - Bain Marie
 - Matériel classique d'un laboratoire de culture cellulaire
-
- Culture media:
 - DMEM 1 g/l glucose
 - Complete DMEM 1 g/l glucose: DMEM 1 g/l glucose, 2 mM L -glutamine or stabilised glutamine, 10 % decompemented FCS, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 1 % non-essential amino acids
 - DMEM 1 g/l glucose 2 times concentrated prepared according to the Operating Method ML03.
 - Complete DMEM 1 g/l glucose 2 times concentrated (2X): DMEM 1 g/l glucose 2 times concentrated, 4 mM L-glutamine or stabilised glutamine, 20 % heat inactivated FCS, 100 UI/ml penicilline, 100 µg/ml streptomycine
 - Dulbecco's PBS Ca²⁺ and Mg²⁺ free and saline solution (NaCl 9 g/l)
 - Low temperature gelling agarose
 - Staining solution: 0.5 mg/ml MTT solution (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in culture medium or neutral red (colour index 50040) at 0.05 mg/ml in the culture medium
 - Petri dishes for cell culture 60 mm
 - Filter paper disks diameter 6 mm
 - Graph paper
 - Water bath
 - Cell culture laboratory classic equipment

Éléments de référence / Reference items :

- **Contrôle négatif** : milieu de culture complet
- **Contrôle positif** : solution de SDS à 3 % - numéro CAS : 151-21-3

- *Negative control: complete culture medium*

- *Positive control: 3 % SDS solution - CAS number: 151-21-3*

Définition des séries / Series definition :

L'élément d'essai pur, ainsi que les éléments de référence, sont testés sur quatre boîtes d'agarose (10 µl par boîte).

The test item pure, as well as the reference items, are tested on four agarose dishes (10 µl per dish).

Protocole de test / Test protocol :

Les cellules sont trypsinées et comptées selon l'instruction de travail IL09.

Des boîtes de pétri sontensemencées avec 4,5 ml d'une suspension cellulaire à $2,5 \times 10^5$ cellules/ml dans du milieu de culture complet, puis mises en culture pendant 18 à 24 heures (37 °C, 5 % CO₂).

Une solution stérile d'agarose est préparée à 2 % dans du PBS selon le Mode Opérateur ML 02 et conservée à 4 °C. Lors de son utilisation, l'agarose 2 % est fondu par chauffage au bain marie à environ 80 °C et mélangé volume à volume avec du milieu de culture 2X complet.

Après élimination du milieu de culture par aspiration, 4,5 ml de solution d'agarose à 1 % (température voisine de 37 °C) sont versés dans chaque boîte.

Après avoir laissé solidifier l'agarose quelques minutes à température ambiante, les boîtes sont mises à 37 °C, 5 % CO₂ pendant 30 ± 10 minutes afin de permettre la stabilisation du système réactif.

Un disque de papier filtre (diamètre 6 mm) est déposé au centre de la boîte à la surface du gel d'agarose.

Ensuite, 10 µl de l'élément d'essai ou de référence sont déposés délicatement sur le disque :

Les cellules sont exposées à l'élément d'essai et aux éléments de référence pendant 24 heures ± 1 heure à 37 °C, 5 % CO₂.

A la fin du temps de traitement, le gel d'agarose est retiré délicatement à l'aide d'une spatule sans endommager le tapis cellulaire.

La révélation se fait à 37 °C, 5 % CO₂, par addition de 2 ml de solution de coloration dans chaque boîte.

Le temps de coloration est de 1 heure ± 30 minutes. La solution est ensuite éliminée par retournement ou aspiration.

The cells are treated with trypsin and counted according to the working instruction IL 09. Petri dishes are seeded with 4.5 ml of the cell suspension containing 2.5×10^5 cells/ml in complete DMEM medium and then cultured for 18 to 24 hours (37 °C, 5 % CO₂).

A sterile agarose solution is prepared at a concentration of 2 % in PBS according to the Operating Methode ML 02 and kept at 4 °C. When used, the 2 % agarose is melted by heating in a water bath around 80 °C and mixed equal volumes with 2X complete culture medium.

After removing the culture medium by aspiration, 4.5 ml of 1 % agarose solution (temperature around 37 °C) are placed in each Petri dish.

After leaving the agarose to solidify few minutes at room temperature, the dishes are placed at 37 °C, 5 % CO₂ for 30 ± 10 minutes to allow the reagents to stabilise.

A disk of filter paper (6 mm diameter) is placed in the centre of the dish on the surface of the agarose gel.

10 µl of the test item or reference item is then spotted carefully onto the disk:

The cells are exposed to the test item and reference items for 24 hours ± 1 hour at 37 °C, 5 % CO₂.

At the end of incubation the agarose gel is removed delicately using a spatula without damaging the cell layer.

Staining is performed at 37 °C, 5 % CO₂ by adding 2 ml of stain solution into each dish. The staining time is 1 hour ± 30 minutes.

The stain solution is removed by turning the dishes over or by aspiration.

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

Après coloration des cellules, une plage non colorée (zone de lyse) peut apparaître au centre de la boîte. Le plus grand et le plus petit diamètre de cette zone sont mesurés avec une feuille de papier millimétrée et le diamètre moyen (DM) est calculé.

La cytotoxicité de l'élément d'essai correspond à la moyenne arithmétique des diamètres moyens mesurés sur les quatre boîtes. Cette valeur est exprimée en centimètre avec deux décimales.

La cytotoxicité obtenue est classée selon l'échelle suivante :

Diamètre Moyen (cm)	Classification
DM < 2	Cytotoxicité faible
$2 \leq DM < 3$	Cytotoxicité modérée
DM ≥ 3	Cytotoxicité importante

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.

Pour valider l'essai en cours, il est indispensable de vérifier les critères de validité du test :

Contrôle négatif : DM < 2
 Contrôle positif : $2 < DM < 3$

After staining the cells, a colourless zone (lysis area) may appear in the centre of the dish. The largest and smallest diameter of this zone are measured with a sheet of millimetre graduated paper and a mean diameter (MD) is calculated.

The cytotoxicity of the test item is the arithmetic mean of the mean diameters measured on the four dishes. This value is expressed in centimetres with two decimal places.

The resulting cytotoxicity is rated according to the following scale:

Mean Diameter (cm)	Classification
MD < 2	Low cytotoxicity
$2 \leq MD < 3$	Moderate cytotoxicity
MD ≥ 3	Important cytotoxicity

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.

In order to validate the test it is essential that the test validity criteria are confirmed:

Negative control : MD < 2
 Positive control : $2 < MD < 3$

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

Aucune déviation ou amendement au plan d'étude n'a été enregistrée au cours de cette étude.

No deviation or amendment to the study plan has been observed during this study.

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

Validation du test / Test validation :

- Le **contrôle négatif** présente un diamètre moyen de **0,00** inférieur à 2 cm
 - Le **contrôle positif** présente un diamètre moyen de **2,25** compris entre 2 et 3 cm
- Ces résultats permettent de valider le test.

- *The negative control shows a mean diameter of 0,00 lower than 2 cm*
 - *The positive control shows a mean diameter of 2,25 comprised between 2 and 3 cm*
- These results allow to validate the test.*

Resultats / Results :

Le **diamètre moyen** (DM) mesuré sur les quatre boîtes de test est égal à **0,00** cm.

Dans les conditions expérimentales retenues, la cytotoxicité de l'élément d'essai **SOLUTION SALINE** code **ID-12/05732** testé **pur**, peut être classée comme **cytotoxicité faible** d'après le barème adopté.

The mean diameter (DM) measured on the four dishes is 0,00 cm.
Under the retained experimental conditions, the cytotoxicity of the test item SOLUTION SALINE code ID-12/05732 pure tested, may be classified as low cytotoxicity 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.

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.

Tableau de résultats / Results table

Expérimentation du 07/01/2013 au 09/01/2013

Experimentation from 07/01/2013 to 09/01/2013

	Contrôle positif / Positive control SDS 3 %			Contrôle négatif / Negative control			Elément d'essai / Test item : ID-12/05732		
	grand diam <i>large diam</i>	petit diam <i>little diam</i>	DM	grand diam <i>large diam</i>	petit diam <i>little diam</i>	DM	grand diam <i>large diam</i>	petit diam <i>little diam</i>	DM
Boîte / <i>Dish</i> 1	2,30	2,30	2,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Boîte / <i>Dish</i> 2	2,30	2,20	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Boîte / <i>Dish</i> 3	2,30	2,20	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Boîte / <i>Dish</i> 4	2,40	2,00	2,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Moyenne des diamètres / Mean diameter	2,25			0,00			0,00		
Classification / Classification	Cytotoxicité modérée <i>Moderate cytotoxicity</i>			Cytotoxicité faible <i>Low cytotoxicity</i>			Cytotoxicité faible <i>Low cytotoxicity</i>		