

REFERENCES

Cde : BON POUR ACCORD DU DEVIS
 Devis : DR19-01248 Rev 1
 Reçu Rouen, le 28/03/19
 Demandeur:
 ClientID: LINGETTES AU LINIMENT
 Description: 3747 EXP 07 20 - 8 205 3 4 18:53
 Nature: Produit cosmétique
 Commentaire:

LOVE & GREEN
 147 AVENUE PAUL DOUMER

92500 RUEIL MALMAISON
 FRANCE

Rouen, le 25 avril 2019

RAPPORT D'ESSAI
 RN19-07617.001

Page 1 / 1

Paramètres	Unités	Résultats
------------	--------	-----------

Détection d'activité oestrogénique : cellulaire (2)
 (Méthode OEDT Cellulaire)

Cf annexe

Résultats validés électroniquement par

Maïmiti BONNEL
 Responsable Projet

Tel : 02 35 07 91 38

Cette validation est une signature électronique, elle est réalisée conformément aux exigences du référentiel ISO 17025.



(1) Essai sous traité dans un laboratoire SGS

(2) Essai sous traité dans un laboratoire partenaire.

Les abréviations ME ou MO citées dans le champ « paramètres » du présent rapport, signifient « Méthode interne » (adaptation du texte de référence si cité après).

Ce document est émis par la Société conformément à ses Conditions Générales de Service, disponibles sur demande ou accessibles sur http://www.sgs.com/terms_and_conditions.htm et, pour les documents sous format électronique, conformément aux termes et conditions régissant l'émission et l'utilisation de documents électroniques sur <http://www.sgs.com/en/Terms-and-Conditions/Terms-a-Documents.aspx>.

Nous attirons votre attention sur les clauses de limitation de la responsabilité, d'indemnisation, de juridiction et d'utilisation des marques (SGS et COFRAC) qui y sont définies. Tout détenteur de ce document est informé que son contenu reflète uniquement les faits tels qu'ils sont relevés par la société au moment de son intervention uniquement et le cas échéant dans la limite des instructions reçues par son client. La société n'est tenue responsable qu'envers son client. Ce document ne saurait exonérer toute partie à une transaction d'exercer pleinement tous ses droits et remplir ses obligations légales et contractuelles. Ce document ne peut pas être reproduit, excepté dans son intégralité, sans accord préalable écrit de la Société.

Toute modification non autorisée, altération ou falsification du contenu ou de la forme du présent document est illégale et les contrevenants sont passibles de toutes poursuites prévues par la loi.

A moins qu'il en soit disposé autrement, les résultats présentés dans ce document se rapportent seulement à l(aux) échantillon(s) analysé(s). Cet (ces) échantillon(s) est (sont) conservé(s) 60 jours seulement (voire moins selon la nature de l(des) échantillon(s)) ou plus de 60 jours selon demande spécifique du client.

ATTENTION : l(les) échantillon(s) dont les résultats enregistrés ici se rapportent a(ont) été prélevé(s) et/ou fourni(s) par le client ou par un tiers agissant pour le compte du client. Les résultats ne constituent aucune garantie de la représentativité de tous les produits de l'échantillon et strictement liés à l'échantillon(s). La Société n'assume aucune responsabilité à l'égard de l'origine ou de la source à partir de laquelle l'échantillon(s) est/ont été extrait(s).

REFERENCE DE L'ETUDE	OEDT-19/0026
DATE DE L'ETUDE	02/04 – 09/04/2019
DONNEUR D'ORDRE	LOVE & GREEN
ELEMENT D'ESSAI	LINGETTES AU LINIMENT
REFERENCE SGS	RN19-07617.001

1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Le test in vitro de détection de l'activité œstrogénique par la méthode OEDT permet une détection des perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique dans un produit par un test cellulaire. En cas d'activité œstrogénique avérée, un dosage exprimé en équivalent œstradiol est calculé selon le modèle d'étude.

2. ELEMENTS D'ESSAI

NOM	LINGETTES AU LINIMENT
REFERENCE	/
LOT	3747
PRESENTATION	Lingettes imprégnées

3. PRINCIPE DE L'ETUDE

Le test in vitro de détection de l'activité œstrogénique par la méthode OEDT s'effectue sur des cellules vivantes (de type levures) génétiquement modifiées pour produire le récepteur aux œstrogènes (ER) à l'aide d'une détection spectrophotométrique. Ces cellules contiennent un gène rapporteur de l'activité œstrogénique codant pour l'enzyme β -galactosidase et dont l'expression est contrôlée par l'activation de ce récepteur en présence d'un perturbateur endocrinien.

En cas de liaison d'un perturbateur endocrinien de type œstrogénique avec le récepteur aux œstrogènes, celui-ci devient actif et le gène rapporteur est exprimé. Ce test permet donc d'évaluer le niveau et la nature du risque biologique associé.

La quantité de perturbateurs de type œstrogénique est déterminée par une mesure de l'activité de la β -galactosidase corrélée à la quantité du complexe récepteur-perturbateurs (ER-PE) formé.

Selon la récente classification¹ établie par le groupe de travail OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) au sujet des perturbateurs endocriniens, les tests *in vitro* de transactivation du récepteur aux œstrogènes (OECD TG 455) et de liaison entre le récepteur aux œstrogènes et les perturbateurs endocriniens sont classés comme tests de niveau 2.

Une récente publication² a montré la cohérence en terme de sensibilité vis-à-vis de la détection des PE entre des lignées cellulaires humaines, telles qu'utilisées dans le test OECD TG 455, et notre modèle de levures.

4. DEROULEMENT DE L'ETUDE

Dates de l'expérimentation :

L'expérimentation a été réalisée du 02/04/2019 au 09/04/2019

Modèle de l'étude : Test cellulaire

Les mesures d'activation du récepteur aux œstrogènes humain recombinant exprimé chez *S. cerevisiae* (W303.1B) ont été reproduites en triplicate de manière indépendante pour chaque concentration testée. Pour chaque concentration, trois mesures sont effectuées.

En parallèle, la courbe d'activité œstrogénique en fonction de la concentration en œstradiol (E2) a été réalisée.

L'activité œstrogénique est montrée dans la figure 1 sous forme d'histogramme pour chaque dilution testée.

¹ OECD RECENT ACTIVITIES ON ENDOCRINE DISRUPTERS TESTING AND ASSESSMENT , Anne Gourmelon, Meeting- Human Health and Environmental Risks of Endocrine Active Substances, 2013.

² Hae Kyung Lee, *et Al.*, The Journal of Toxicological Sciences, Vol 37, N°2, 431-437, 2012

Les résultats en termes d'activité œstrogénique sont normalisés selon la formule suivante :

$$\text{Activité œstrogénique relative} = (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{min}}) / (A_{\text{max}} - A_{\text{min}})$$
$$A_{\text{min}} = A_{\text{solvant}}$$
$$A_{\text{max}} = A_{\text{E2max}}$$

Afin d'exprimer les valeurs d'activité œstrogénique en équivalent œstradiol (contenu dans le milieu de culture), on utilise la courbe de calibration d'activité œstrogénique en fonction de la concentration en œstradiol (E2) (figure 2). Si la valeur d'activité œstrogénique est trop faible, il est alors impossible de calculer un équivalent œstradiol. On en déduit que le produit ne présente pas d'activité œstrogénique selon le modèle d'étude utilisé.

Si au contraire l'activité œstrogénique permet de calculer un équivalent œstradiol, on calcule l'équivalent d'œstradiol circulant chez l'homme sur la base de notre modèle. Ce dernier intègre, un principe de précaution, une notion d'usage (en fonction du produit testé) et une notion de seuil et donc de risque potentiel.

Postulat de l'étude

Le produit est absorbé en totalité par la peau et dilué dans le volume de sang circulant dans le corps (environ 5L). Les molécules présentes dans le produit ne sont pas métabolisées par l'Homme en d'autres molécules plus ou moins toxiques.

Notion de seuil – risque potentiel

Les quantités d'œstradiol E2 circulant (exprimée en g/5L) naturellement chez « l'homme » sont exprimées ci-dessous :

- Chez la femme ménopausée/Chez l'homme : $4.0 \times 10^{-11} - 2.0 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$
- Chez la femme non ménopausée (hors ovulation) : $1.0 \times 10^{-10} - 6.0 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$
- Chez la femme (ovulation) : $2.0 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$

Selon le modèle d'étude, une valeur est considérée comme critique lorsqu'elle est égale ou supérieure à la moitié du taux d'œstradiol moyen circulant chez la femme en ovulation, soit $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$.

Protocole du test cellulaire

1. Préparation de la pré-culture dans un milieu sélectif : la pré-culture, préparée à partir d'un stock glycérolé de levures *S. cerevisiae* co-transformées, est incubée à 30°C sous agitation pendant 14h.
2. Préparation de la culture dans un milieu enrichi : 150mL de milieu de culture sont ajustés avec du milieu de pré-culture de sorte que l'absorbance mesurée à 600nm soit de 0,1. La culture est ensuite incubée à 30 °C sous agitation pendant 8h.

3. Induction de l'expression du récepteur aux œstrogènes : dès que l'absorbance à 600nm est de 0,4 - 0,6. L'expression du récepteur aux œstrogènes (hER α) est induite (révélée) par ajout de galactose dans le milieu de culture.

4. Préparation de l'échantillon à tester

Les mesures ont été effectuées sur l'échantillon à tester dilué.

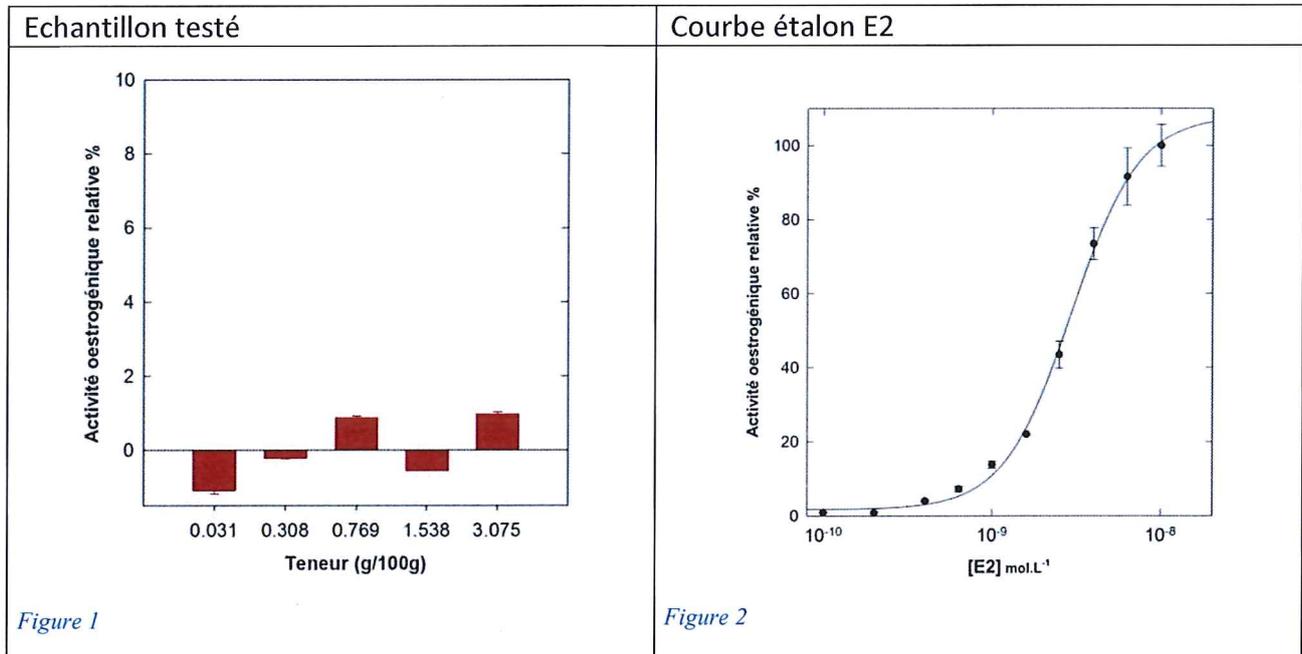
5. Stimulation de la culture (1mL) par ajout de 10 μ L de solution d'œstradiol pur (E2) afin d'obtenir la courbe de référence (incubation à 30°C sous agitation pendant 6h)

6. Stimulation de la culture (1mL) par ajout de 10 μ L de l'échantillon à tester, plus ou moins dilué, (incubation à 30°C sous agitation pendant 6h).

7. Mesure des activités transcriptionnelles.

5. RESULTATS

Les résultats des mesures d'activités pour évaluer le risque biologique associé à une activité œstrogénique sont présentés ci-dessous.



6. CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales, le produit **LINGETTES AU LINIMENT, lot 3747** ne présente pas d'activité œstrogénique selon le modèle d'étude utilisé.

Véronique LE TILLY / BIOLOGISTE
Le 11/04/2019,

