6

ACUTE TOXICITY STUDY

GOALS:

Assessment of the acute toxicity of the Padina Pavonica whole extract (AP 099301) in mice.

STUDY MATERIALS:

Animals: 40 NMRI male mice with standard health status were used. Average weight was 15 g. These animals were provided by IFFA CREDO breeding farm, Domaine des Oncins, 69210 L'ARBRESLE, France.

Quarantine: the animals were maintained under observation for a period of 8 days, during which various general testings were performed on the animals. They were thus given time to adapt themselves to their new housing conditions and their new diet.

Housing: the mice were housed in polypropylene cages (size 46.5*31*19 cm) equipped with dust-free sawdust.

Identification: the animals were identified with a sheet attached to each cage indicating the study number, batch number and starting date of the study.

Water and food: the animals were given tap water ad libidum each morning and pelleted feed (UAR) ad libidum every day.

Cleaning: the litter was changed on a daily basis and equipped with dust-free sawdust (LITALABO SPS).
Watering bottles were changed twice a week. The floor was washed each day with chlorinated water. The animal house was sterilized at least once a year, or whenever necessary.

METHOD:

Per os administration of the product as follows:

In the 10 animals of batch 1	25 mg per kg body weight i.e. 0.4 mg per animal
In the 10 animals of batch 2	250 mg per kg body weight i.e. 4 mg per animal
In the 10 animals of batch 3	1250 mg per kg body weight i.e. 20 mg per animal
In the 10 animals of batch 4	2500 mg per kg body weight i.e. 40 mg per animal

Mortality study performed for each batch 7 days after administration with calculation of LD0, LD10 and LD50.
Animals were put to death and histological samples were taken (at least kidney, liver).

RESULTS:

Mortality study performed 7 days after administration is summed up in table 1 hereafter. No mortality was observed 7 days after per os administration of the product, whatever the dose. Also, no alteration in the behavior of animals was observed.

Histological results showed nothing unusual.

CONCLUSIONS:

No lethal effect for the single per os administration of product doses of Padina Pavonica whole extract at 0.4, 4, 20 and 40 mg per animal in mice.

No behavioral alterations further to the administration of the same doses.

Marcy, November 16,2000

Professeur Michel FRANCK

MINISTÈRE de L'AGRICULTURE
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE
de LYON
1, avenue Bourgelat, 1
B.P. 83
69280 MARCY L'ÉTOILE
Tél. 78 87.00.34

Batch number	Dose	Nb of animals alive before administration	Nb of animals alive after administration	Nb of dead animals
Batch 1	25 mg/kg	10	10	0
Batch 2	250 mg/kg	10	10	0
Batch 3	1250 mg/kg	10	10	0
Batch 4	2500 mg/kg	10	10	0

Table 1: Results for the single per os administration of Padina Pavonica whole extract (AP 099301).

Professeur M.FRANCK
Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

1, Av Bourgelat
BP 83
69280 MARCY L'ETOILE

Je soussigné, Michel FRANCK,
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
Expert clinicien agrée par le Ministére de l'Agriculture et de la Forêt
(arrêté Ministériel du 25/03/19988, J.O. du 06.05.88)

ai procédé,

à la demande du Laboratoire

TEXINFINE
60 Rue Duguesclin
BP 6114
69466 LYON Cedex 06

à l'expertise de la spécialité dénommée

AP 099301

en vue de la détermination de sa toxicité aigue

A Marcy, le 25 Janvier 1994,

Professeur M. FRANCK

RESUME

Objet: Evaluation de la toxicité aigue du produit AP 099301 aprés administration par voie orale chez la souris

Expert: Professeur M. FRANCK

Laboratoire de recherche: SOFREDE S.A

Directeur de recherche: Dr S.MARTINOT

CONCLUSIONS:

1/ Absence de mortalité suite à l'administration par voie orale d'une dose unique de 0.4, 4, 20 et 40 mg de AP 099301 par animal chez la souris,

2/ Lésions histologiques hépatocytaires chez les animaux ayant reçu 40 mg par animal. Les histologies n'ont pas été réalisées dans les autres lots,

3/ Absence de modifications histologiques au niveau rénal et osseux chez les animaux ayant reçu 40 mg d'AP 099301 par animal. Les histologies n'ont pas été réalisées sur les autres lots.

CONCLUSION GENERALE:

-Absence d'effet léthal du produit administré par voie orale en une prise aux doses de 0.4, 4, 20 et 40 mg chez la souris.

-Lésions hépatiques importantes chez les animaux ayant reçu 40 mg d'AP 099301 par animal

ETUDE DE TOXICITE AIGUE
Produit AP 099301

OBJECTIFS:

Evaluation de la toxicité aiguë du produit AP 099301 lors d'une administration unique par voie orale chez la souris

REACTIF EXPERIMENTAL:

Animaux: 40 Souris NMRI, statut sanitaire conventionnel, de sexe mâle sont utilisés. Le poids moyen est de 15 g. Ces animaux sont issus de l'élevage IFFA CREDO, Domaine des Oncins 69210 L'ARBRESLE.

Quarantaine: les animaux sont mis pendant 8 jours en observation. Cette période est mise à profit pour effectuer un examen général des animaux et leur permettre de s'acclimater à leurs nouvelles conditions d'habitat et à leur nouveau régime alimentaire.

Stabulation: les souris sont logées dans des cages en polypropylène de dimensions 46.5*31*19 cm équipées de sciure dépoussiérée.

Identification: les animaux sont identifiés grâce à une fiche apposée sur chaque cage précisant le N° de l'étude, le N° du lot et la date de début de l'étude.

Boisson et alimentation: l'eau de ville est fournie à volonté chaque jour le matin. L'alimentation est donnée chaque jour à volonté sous forme de granulés (UAR).

Entretien: les bacs sont changés quotidiennement et munis de sciure dépoussiérée(LITALABO SPS).
Les biberons sont changés 2 fois par semaine. Les sols sont lavés chaque jour à l'eau chlorée. L'animalerie est stérilisée une fois par an au moins, ou à chaque fois que nécessaire.

METHODE:

Administration par voie buccale en une prise du produit à raison de :

- 10 fois la dose usuelle chez 10 animaux du lot 1 soit 0.4 mg par animal
- 100 fois la dose usuelle chez 10 animaux du lot 2 soit 4 mg par animal
- 500 fois la dose usuelle chez 10 animaux du lot 3 soit 20 mg par animal
- 1000 fois la dose usuelle chez 10 animaux du lot 4 soit 40 mg par animal

Etude de la mortalité dans chaque lot 7 jours après l'administration avec détermination de la DL0, DL 10 et DL 50.
Sacrifice des animaux et prélèvements histologiques chez 5 animaux du lot 4 (rein , foie et os) et chez 5 animaux témoins (os)

RESULTATS:

L'Etude de la mortalité 7 jours après administration est résumée dans le tableau 1 ci-joint. On constate que l'administration de produit par voie buccale n'a entraîné aucune mortalité à 7 jours et ce quelque soit la dose. D'autre part aucunes modifications du comportement des animaux n'a été observée.

N° Lot	Dose	Nbr animaux vivants avant administration	Nbr animaux vivants aprés administration	Nbr animaux morts
Lot 1	0.02 g/kg	10	10	0
Lot 2	0.2 g/kg	10	10	0
Lot 3	1 g/kg	10	10	0
Lot 4	2 g/kg	10	10	0

Tableau 1: Résultats administration per os unique de AP 099301

Résultats histologiques:

5 animaux du lot 4 ont été euthanasiés à l'issu des 7 jours d'observation et on a réalisé des prélévements de foie, rein et os sur ces animaux. Les résultats sont les suivants:

1.Biopsies hépatiques:

- Animal N°1: Fibrose péricanalaire débutante avec néo formation ductulaire s'accompagnant d'un discret infiltrat lymphocytaire avec souffrance hépatocytaire au voisinage des espaces portes. Absence de cholestase. Les altérations hépatocytaires appparaissent d'aspect régénératif.

-Animal N°2: Absence de fibrose significative. Suffusions hémorragiques intra parenchymateuses. Congestions vasculaires diffuses avec nécrose hépatocytaire sans caractére inflammatoire. Absence de cholestase.

-Animal N°3: Absence de fibrose portale. Absence d'élements inflammatoires. Absence de cholestase. Congestion hépatique diffuse. Au niveau des hépatocytes, on observe une clarification et une ballonisation diffuse ainsi qu'une nécrose hépatocytaire péricanalaire avec caryorrhexis.

-Animal N°4: Absence de fibrose péricanalaire. Lésions hépatocytaires marquées par une ballonisation et une binucléation périvasculaire. Absence de caractére inflammatoire. Absence de cholestase. Absence de congestion hépatique diffuse avec souffrance hépatocytaire.

-Animal N°5: Discrète fibrose péricanalaire non sténosante. Clarification hépatocytaire avec ballonisation et binucléation témoignant d'une souffrance hépatocytaire. Absence de nécrose et d'éléments inflammatoires.

2. Biopsies rénales:

-Animal N°1: Biopsie rénale a structure histologique proche de la normale sans caractére inflammatoire ni nécrose. La corticale et la médullaire ne présentent pas d'altération dystrophique.

-Animal N°2: idem animal 1

- Animal N°3: idem animal 1

-Animal N°4: idem animal N°1

3.Biopsies osseuses:

-Prélévements réalisés sur les animaux ayant reçus 40 mg de produit:

Corticale trés proche de la normale. Les travées osseuses correspondent à l'aspect histologique habituel avec calcification normale. Absence d'atrophie osseuse, d'ostéomalacie et d'ostéolyse. Il n'a pas été observé d'hyper ostose, ni de nécrose osseuse. En conclusion, absence d'altérations histologiques significatives au niveau de l'ensemble des prélévements osseux.

-Prélévements réalisés sur des animaux témoin n'ayant pas reçu de produit:

Corticale proche de la normale. Des travées osseuses correspondent à l'aspect histologique habituel.

CONCLUSIONS:

- Absence d'effet létal pour l'administration unique per os de doses de produit AP 099301 de 0.4, 4, 20 et 40 mg par animal chez la souris.

-Pas de modifications comportementales suite à l'administration des mêmes doses.

-Souffrance hépatocytaire avec modifications de la structure histologique des hépatocytes chez 100 % des animaux sur lesquels on a réalisé une histologie dans le lot ayant recu 40 mg par animal.

-Absence de modifications rénales chez les animaux sur lesquels on a réalisé une histologie.

- Absence de modifications au niveau de la structure histologique osseuse par rapport à un groupe témoin n'ayant pas reçu de produit

à Marcy le 25/01/94

Dr S.MARTINOT

Professeur M.FRANCK

ESSAIS DE TOXICITE AIGUE

Produit AP 099301

Laboratoire de recherche:SOFREDE S.A
30 Chemin des mouilles, 69290 Grézieu La Varenne
Expert: Professeur M. FRANCK
Directeur de recherche: Dr S.MARTINOT

N° Lot	Dose	Nbr animaux vivants avant administration	Nbr animaux vivants aprés administration	Nbr animaux morts
Lot 1	0.02 g/kg	10	10	0
Lot 2	0.2 g/kg	10	10	0
Lot 3	1 g/kg	10	10	0
Lot 4	2 g/kg	10	10	0

Tableau 1: Résultats administration per os unique de AP 099301

CONCLUSIONS:

- Absence d'effet létal pour l'administration unique per os de doses de produit AP 099301 de 0.4, 4, 20 et 40 mg par animal chez la souris.

-Pas de modifications comportementales suite à l'administration des mêmes doses.

à Marcy le 10/11/93
Professeur M.FRANCK

METHODE:

Administration par voie buccale du produit à raison de :

- 10 fois la dose usuelle chez 10 animaux du lot 1 soit 0.4 mg par animal
- 100 fois la dose usuelle chez 10 animaux du lot 2 soit 4 mg par animal
- 500 fois la dose usuelle chez 10 animaux du lot 3 soit 20 mg par animal
- 1000 fois la dose usuelle chez 10 animaux du lot 4 soit 40 mg par animal

Etude de la mortalité dans chaque lot 7 jours après l'administration avec détermination de la DL0, DL 10 et DL 50.
Sacrifice des animaux et prélèvements histologiques (à minima rein, foie)

RESULTATS:

L'Etude de la mortalité 7 jours après administration est résumée dans le tableau 1 ci-joint. On constate que l'administration de produit par voie buccale n'a entraîné aucune mortalité à 7 jours et ce quelque soit la dose. D'autre part aucunes modifications du comportement des animaux n'a été observée.

Les résultats histologiques seront fournis ultérieurement.

ETUDE DE TOXICITE AIGUE

OBJECTIFS:

Evaluation de la toxicité aiguë du produit AP 099301 chez la souris

REACTIF EXPERIMENTAL:

Animaux: 40 Souris NMRI, statut sanitaire conventionnel, de sexe mâle sont utilisés. Le poids moyen est de 15 g. Ces animaux sont issus de l'élevage IFFA CREDO, Domaine des Oncins 69210 L'ARBRESLE.

Quarantaine: les animaux sont mis pendant 8 jours en observation. Cette période est mise à profit pour effectuer un examen général des animaux et leur permettre de s'acclimater à leurs nouvelles conditions d'habitat et à leur nouveau régime alimentaire.

Stabulation: les souris sont logées dans des cages en polypropylène de dimensions 46.5*31*19 cm équipées de sciure dépoussiérée.

Identification: les animaux sont identifiés grâce à une fiche apposée sur chaque cage précisant le N° de l'étude, le N° du lot et la date de début de l'étude.

Boisson et alimentation: l'eau de ville est fournie à volonté chaque jour le matin. L'alimentation est donnée chaque jour à volonté sous forme de granulés (UAR).

Entretien: les bacs sont changés quotidiennement et munis de sciure dépoussiérée(LITALABO SPS).
Les biberons sont changés 2 fois par semaine. Les sols sont lavés chaque jour à l'eau chlorée. L'animalerie est stérilisée une fois par an au moins, ou à chaque fois que nécessaire.

CONCLUSION

▸▸▸ L'actif n'est pas une protéine.

▸▸▸ L'actif résiste à la digestion enzymatique

▸▸▸ L'actif n'a révélé aucune toxicité orale aigüe jusqu'à 100 fois la dose thérapeutique.

ETUDE DE TOXICITE AIGUE CHEZ LA SOURIS

Elle a été réalisée au laboratoire du Professeur Michel FRANCK à l'Ecole Vétérinaire de Lyon (rapport en annexe).

METHODE :

L'administration par voie orale a été réalisée à raison de :

→ 10 fois la dose envisagée chez 10 animaux du lot 1 soit 0.4 mg par animal,
→ 100 fois la dose envisagée chez 10 animaux du lot 2 soit 4 mg par animal,
→ 500 fois la dose envisagée chez 10 animaux du lot 3 soit 20 mg par animal,
→ 1000 fois la dose envisagée chez 10 animaux du lot 4 soit 40 mg par souris.

RESULTATS :

On constate que l'administration du produit par voie orale n'a entraîné aucune mortalité à 7 jours et ce quelle que soit la dose. De plus, aucune modification du comportement des animaux n'a été observée.

②

ESSAI DE TOXICITE AIGUE CHEZ LA SOURIS

Elle a été réalisée au laboratoire du Professeur Michel FRANCK à l'Ecole Vétérinaire de Lyon (rapport en annexe).

METHODE :

L'administration par voie orale a été réalisée à raison de :

→ 10 fois la dose envisagée chez 10 animaux du lot 1 soit 0.4 mg par animal,
→ 100 fois la dose envisagée chez 10 animaux du lot 2 soit 4 mg par animal,
→ 500 fois la dose envisagée chez 10 animaux du lot 3 soit 20 mg par animal,
→ 1000 fois la dose envisagée chez 10 animaux du lot 4 soit 40 mg par souris.

RESULTATS :

Absence de lésion rénale chez la souris, présence de lésions de souffrance hépatique pour les animaux traités aux plus fortes doses : 40mg par souris (15 grammes) et par jour.
Cette dose correspond à l'absorption en une seule prise de 4900 comprimés à 50 mg.