

Production d'aliments pour rats pour une étude de 6 mois

Feed production for a 6 month study in rats

Technical specifications

1 – GÉNÉRALITÉS

1.1 Objet de l'étude expérimentale (Background)

L'INRA en collaboration avec l'INSERM et l'ANSES développe une étude sur les effets potentiels à long terme de l'ingestion d'OGM chez le rat.

Ce programme de recherche considère que les analyses actuellement effectuées dans le cadre des études de toxicité à 90 jours conformément aux lignes directrices de l'OCDE et l'EFSA, pourraient inclure les concepts et technologies récentes, en vue d'optimiser leur caractère prédictif. Ces avancées récentes incluent les nouvelles analyses biologiques et physiologiques développées ces dernières années. Ce programme, en se basant sur ces techniques, vise à identifier des biomarqueurs précoces de toxicité pour améliorer la prédictivité des tests de toxicité à 90 jours des plantes génétiquement modifiées (PGM).

Dans cette optique, le programme inclut une étude expérimentale de 6 mois dans laquelle des rats nourris avec 2 maïs génétiquement modifiés seront comparés à leurs contrôles négatifs respectifs (nourris avec des maïs non-OGM génétiquement proches). Les rats seront exposés au MON 810 (maïs Bt) ou NK 603 (résistent au glyphosate) traité ou non à un herbicide contenant du glyphosate. L'objectif sera de suivre ces nouveaux paramètres exploratoires et d'étudier les variations entre les groupes de rats. Cependant, l'étude expérimentale devra se rapprocher le plus possible des protocoles de test de toxicité orale subchronique chez le rongeur : à 90 jours chez le rat (lignes directrices OCDE 408) et à 90 jours pour les doses répétées sur aliment entier (lignes directrices EFSA).

INRA in collaboration with INSERM and ANSES aims at developing an experimental design on the potential effect of GMO feeding in rats.

The present program considers that tests samples and analysis performed in the current rodent 90-days (90d) study according to OECD and EFSA guidelines may be able to evolve by exploiting the most advanced concepts and technologies, in order to optimize their predictive character. These changes include taking into account advances in biological and physiological testing and systems analysis in recent years. Based on these advances, the program aims at identifying early biomarkers of toxicity to improve the predictability of the rodent 90d studies applied to Genetically Modified Plants (GMP).

For this purpose, the program will conduct a **rat study during six months on groups of animals fed two GM maizes compared to groups of negative control animals** (animals fed with genetically close non-GMO maize). The animals will be exposed for a period of 6 months to MON 810 (Bt resistance) or NK603 (glyphosate resistance) treated or not by the glyphosate herbicide. The followed approach, namely the exploration of new

parameters for monitoring animals will be to identify variations between groups. Meanwhile, the animal trial will have to be as close as possible to subchronic oral toxicity rodent: 90 days study in rats according to OECD guideline 408 and EFSA guidance on conducting repeated dose 90 days oral toxicity study in rodents on whole food/feed.

1.2 Calendrier de la procédure (Indicative procedure timetable)

Le début de l'expérimentation est prévu en mai 2015 et elle durera 6 mois pour chaque rat après une période d'acclimatation (15 j).

The beginning of experiment wanted is may 2015 and the experiment will last 6 months for each rat after an acclimatization period (15d).

1.3 Prestations à la charge du prestataire et limites de prestation (Provider's tasks and scope of the service) :

Le prestataire devra fournir les régimes alimentaires pour toute la durée de l'expérimentation. Il devra également envoyer des échantillons des différents régimes pour analyse aux adresses communiquées ultérieurement.

Les transports du maïs (du lieu de stockage vers l'usine de fabrication et de l'usine vers le lieu de l'expérimentation) pourront être proposés par le prestataire.

The service provider will produce the diets necessary for all the experiment. He will send samples for analysis to the laboratories (addresses will be given later).

The transport (from storehouse to the factory and from factory to the experimental site) can be organized by the service provider.

2. DESCRIPTION DES REGIMES SOUHAITES (TECHNICAL SPECIFICATIONS FOR DIET PREPARATION)

2.1 DESIGN EXPERIMENTAL (EXPERIMENTAL DESIGN)

Les rats seront répartis selon leur régime alimentaire en 8 groupes de 30 rats. Au sein de chaque régime, les rats seront répartis en 2 sous-groupes :

Le sous-groupe 1 : 10 rats/régime sont gardés pendant 90 jours

Le sous-groupe 2 : 20 rats/régime seront gardés pendant 180 jours

Cette période expérimentale sera précédée d'une période d'acclimatation de 15 jours.

En plus de ces rats expérimentaux, des rats « sentinelles » seront ajoutés pour chaque type de maïs (MON 810 et NK 603).

Rats will be divided in 8 groups of 30 rats according to the diet. Inside each group, rats will be divided into 2 sub-groups:

Sub-group 1: 10 rats/diet followed during 90 days

Sub-group 2: 20 rats/diet followed during 180 days

Moreover these rats, there will be sentinels for each type of corn (MON 810 et NK 603).

2.2 MAÏS (MAIZE)

Deux cultures ont été effectuées pour chaque variété de maïs : NK 603, MON 810, variétés isogéniques associées non génétiquement modifiées et NK 603 cultivé avec du Roundup. Des analyses sont en cours qui détermineront notre choix d'une culture.

Ces 5 variétés de maïs utilisées sont stockées sous forme de grains en sacs:

DKC6667YG (MON810) : sacs de 500 kg

DKC6666 (variété isogénique du MON 810 non GM) : sacs de 500 kg

Pioneer 8906R (NK603) + RR : sacs de 1000 kg

Pioneer 8906R (NK603): sacs de 1000 kg

Pioneer 8906 variétés isogéniques du NK 603 non GM) : sacs de 800 ou 1000 kg.

Two harvests have been done for each variety: NK 603, MON 810, corresponding isogenic non GM varieties and NK 603 grown with Roundup. We are running analyses to choose between the 2 harvests.

The 5 varieties used are stored as kernels in big bags:

DKC6667YG (MON810) : bags of 500 kg

DKC6666 (MON 810 isogenic non GM varieties): bags of 500 kg

Pioneer 8906R (NK603) + RR: bags of 1000 kg

Pioneer 8906R (NK603): bags of 1000 kg

Pioneer 8906 (NK 603 isogenic non GM varieties): bags of 800 or 1000 kg.

2.3 ALIMENTATION (FEEDING)

Les rats seront nourris en pseudo ad-libitum, avec distribution de la quantité pour trois ou quatre jours, les aliments devant être renouvelés deux fois par semaine.

Pour les calculs de quantités nécessaires, nous avons considéré une consommation quotidienne de 30 g/rat.

Tous les aliments fabriqués et utilisés devront être considérés comme des aliments complets pour rats en croissance, c'est-à-dire aptes à assurer l'entretien et la croissance de rats. Ils devront respecter les normes NRC 1995, être isoprotéiques et isoénergétiques, et ne pas contenir de matières premières d'origine animale.

Pendant la période d'acclimatation, les rats seront nourris avec un régime classique pour rat en croissance (à environ 18% PB). Ce régime classique ou standard devra contenir si possible les mêmes matières premières que les régimes testés ensuite, donc du maïs, du blé et/ou co-produit, du tourteau de soja et de l'huile de soja... de manière à limiter les effets du changement d'alimentation. Aucun ingrédient ne devra être génétiquement modifié (maïs, soja...).

Pendant la période expérimentale, ils seront nourris avec un régime contenant plus ou moins de maïs, OGM ou non. Aucun autre ingrédient ne devra être génétiquement modifié (soja...).

La teneur en maïs des 8 régimes expérimentaux, le nombre de rats et les quantités de chaque régime requises sont les suivantes : **tableau 1** ci-dessous.

Regimen	isogenic non GM MON810 (%)	MON810 (%)	isogenic non GM NK603 (%)	NK603 (%)	NK603+glyphosate (%)	Number rats for a group	Number of days	Quantities (kg)
1	33	0				20	90	270
						40	180	
2	22	11				20	90	270
						40	180	
3	0	33				20	90	270
						40	180	
sentinels MON						6	90	49
						6	180	
4			33	0	0	20	90	270
						40	180	
5			22	11	0	20	90	270
						40	180	
6			0	33	0	20	90	270
						40	180	
7			22	0	11	20	90	270
						40	180	
8			0	0	33	20	90	270
						40	180	
sentinels NK						6	90	49
						6	180	

Avec une marge de sécurité, il faut donc prévoir de fabriquer 320 kg d'aliment par lot, et fournir 400 kg d'aliment témoin (15 jours x 30 g x 504 rats + 100 kg pour les rats sentinelles pendant la période expérimentale), ce qui représente une capacité de fabrication de 2960 kg d'aliments (+ wash-out). Un échantillon d'au moins 3 kilos par régime et par lot de production sera conservé (4°C), conditionné par kg et envoyé pour analyse.

Les régimes fabriqués doivent inclure les ingrédients ci-dessous : maïs, remoulage, farine de blé, tourteau de soja 48, huile de soja, levures, minéraux, vitamines, acides aminés de synthèse si nécessaire (DL méthionine et L-lysine, choline) pour permettre d'obtenir la composition chimique suivante, **après irradiation**:

- Energie métabolisable 13 – 14 MJ/kg,
- Protéines brutes 170-190 g/kg,
- lysine 9-12 g/kg,
- méthionine 4-7 g/kg,
- cellulose brute 30-50 g/kg,
- minéraux 35-50 g/kg,
- vitamine B1 : min 10 mg/kg
- choline

La quantité totale d'isoflavone (en équivalent aglycone) ne devra pas dépasser 250 mg/kg d'aliment complet. La dose d'irradiation devra être précisée et justifiée.

Tous les régimes devront être fabriqués dans un court laps de temps (maximum une semaine), et se présenter de la même manière (même apparence : diamètre et longueur des granulés, ensachage en sacs de 20 à 25 kg au maximum sous vide, même dose d'irradiation). Aucune contamination ne sera admise (nécessité de prévoir un wash-out entre deux lots et commencer par les régimes ne contenant pas d'OGM).

Le maïs fourni devra être broyé juste avant la fabrication des régimes.

Les régimes seront conservés à température ambiante (20°C) puis transportés jusqu'à leur lieu d'utilisation.

Rats will be fed in a pseudo ad-libitum manner, with distribution of amounts for 3 or 4 days. Feed will be changed twice a week.

To calculate quantities needed, we considered feed consumption would be 30 g/day/rat.

All feed produced should be complete adapted for growing rats, that is covering requirements for maintenance and growing. Feed formula will follow NRC 1995, will be isoproteic and isoenergetic and will contain no animal ingredients.

During acclimatization, rats will be fed a standard diet for growing rats (about 18% crude protein). This standard diet should contain the same ingredients as tested diets that is maize, wheat and /or coproduct, soybean meal and soy oil... in order to limit effects of diet change. The diet mustn't contain any genetically modified ingredient (maize, soya...).

During experimental period, rats will be fed diets containing more or less maize, GMO or not. These diets mustn't contain any genetically modified ingredient (maize, soya...).

Maize content of the 8 experimental diets, number of rats and quantities needed for each diet are described in Tableau 1.

Including a safety margin, 320 kg of each experimental diet has to be produced and 400 kg of the standard diet for acclimatization (15 days x 30 g x 504 rats + 100 kg for sentinels during experimental period), which represent a capacity of production of 2960 kg of feed (+ wash-out). A sample of at least 3 kg per diet and per batch will be kept (4°C), conditioned in 1kg and sent for analysis.

Ingredients must include maize, wheat midds, wheat, soybean meal 48%, soybean oil, yeasts, minerals, vitamins, and synthetics amino acids if necessary to guarantee this chemical composition, **after irradiation**:

- métabolisable energy 13 – 14 MJ/kg,
- crude protéins 170-190 g/kg,
- lysine 9-12 g/kg,
- méthionine 4-7 g/kg,
- crude fibre 30-50 g/kg,
- minéraux 35-50 g/kg,
- vitamin B1 : min 10 mg/kg
- choline

Total isoflavone quantity (aglycone equivalent) mustn't exceed 250 mg/kg of complete feed. Irradiation dose will be indicated and justified.

All diets will be prepared in short time lapse (one week maximum), and have the same appearance (same diameter and length, conditioned in bags of 20 to 25 kg max. vacuum packed, same irradiation dose). No contamination allowed (wash-out between two batches and begin with non GMO diets).

Maize will be broiled shortly before use.

Diets will be kept at room temperature (20°C) and transported to the place of use.