



INSTITUT NATIONAL DE LA  
RECHERCHE AGRONOMIQUE

**CENTRE DE RECHERCHES DE TOULOUSE**  
**24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville Tolosane**  
**CS 52627**

**31326 CASTANET-TOLOSAN CEDEX**

**CAHIER DES CLAUSES TECHNIQUES PARTICULIERES**

**PROJET DE RECHERCHE GMO90+ :**  
**Etude expérimentale de 6 mois sur les effets de l'ingestion**  
**quotidienne de maïs OGM**

**POUVOIR ADJUDICATEUR**

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**  
**CENTRE DE TOULOUSE**

# SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>GENERALITES .....</b>	<b>3</b>
1.1	Objet de l'étude expérimentale.....	3
1.2	Calendrier de la procédure .....	3
1.3	Conformité aux documents officiels .....	3
1.3.1	<i>Bien être animal &amp; éthique .....</i>	<i>3</i>
1.3.2	<i>Dispositifs, ressources humaines et organisation.....</i>	<i>3</i>
1.4	Ressources matérielles et intellectuelles.....	3
1.5	Prestations à la charge du soumissionnaire.....	4
1.6	Limites de prestations.....	5
<b>2</b>	<b>DESCRIPTION DE L'ETUDE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>5</b>
2.1	<b>Animaux.....</b>	<b>5</b>
2.1.1	<i>Espèce animale et souche .....</i>	<i>5</i>
2.1.2	<i>Nombre d'animaux .....</i>	<i>5</i>
2.1.3	<i>Age et poids de départ.....</i>	<i>5</i>
2.1.4	<i>Identification des animaux.....</i>	<i>6</i>
2.1.5	<i>Hébergement.....</i>	<i>6</i>
2.1.6	<i>Alimentation des rats .....</i>	<i>6</i>
2.2	<b>Design experimental.....</b>	<b>6</b>
2.2.1	<i>Ressources humaines.....</i>	<i>7</i>
2.2.2	<i>Acclimatation.....</i>	<i>7</i>
2.2.3	<i>Répartition des animaux dans les groupes.....</i>	<i>7</i>
2.2.4	<i>Traitement : régimes alimentaires .....</i>	<i>7</i>
2.3	<b>Mesures et échantillons.....</b>	<b>7</b>
2.3.1	<i>Santé des animaux .....</i>	<i>7</i>
2.3.2	<i>Collecte des échantillons .....</i>	<i>7</i>
2.4	<b>Réception .....</b>	<b>12</b>
2.5	<b>Obligation de résultats.....</b>	<b>12</b>

## **1 GENERALITES**

### **1.1 Objet de l'étude expérimentale**

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 directives 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).

### **1.2 Calendrier de la procédure**

Le début de l'expérimentation est prévu en avril 2015 et elle durera 6 mois pour chaque rat. Le délai d'exécution du contrat est fixé à un an. Ce délai pourra être modifié en commun accord entre les signataires du marché au vu de l'avancement des expérimentations.

### **1.3 Conformité aux documents officiels**

#### *1.3.1 Bien être animal & éthique*

L'étude expérimentale sera effectuée en accord avec la directive européenne 2010/63/EU du Parlement et du Conseil Européens du 22 septembre 2010 sur la protection des animaux utilisés dans le cadre d'études scientifiques, telle que transposée au niveau national et approuvée, en accord avec la convention européenne de protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou autres fins scientifiques.

#### *1.3.2 Dispositifs, ressources humaines et organisation*

Il est demandé que le centre dans lequel aura lieu l'expérimentation soit certifié ISO 9001. L'étude expérimentale ne doit pas forcément suivre les règles BPL mais s'en approcher serait un plus.

### **1.4 Ressources matérielles et intellectuelles**

Le soumissionnaire fournira les animaux, le matériel et les personnes nécessaires au projet.

Le consortium est une organisation créée pour ce projet et regroupe plusieurs universités et instituts nationaux ainsi que des partenaires privés. L'INRA sera l'intermédiaire entre le consortium et l'exécutant du contrat.

Ce programme de recherche est un programme sur 3 ans financé par le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie. Il est coordonné par Bernard Salles (INRA) et sera le référent scientifique du projet pour l'exécutant.

Les laboratoires du consortium feront une partie des analyses et dosages, l'autre partie sera faite par l'exécutant.

Le consortium fournira la nourriture des animaux et les formations spécifiques pour certains prélèvements d'organes.

## 1.5 Prestations à la charge du soumissionnaire

*Au moment de la candidature, le candidat doit décrire:*

- les installations expérimentales devront être identifiées et localisées. Des précisions seront apportées concernant le statut sanitaire, les agréments vétérinaires des installations.
- le système d'identification individuelle des rats
- la localisation et les conditions d'hébergement des animaux (nombre de pièces, statut sanitaire, température, pression, humidité, cycles jour/nuit, enregistrement, types de cages...). Des précisions sur les procédures de nettoyage des salles, du matériel d'hébergement et de nourrissage devront être données.
- conditions de réception et d'acclimatation des animaux. En particulier, la durée d'acclimatation, les conditions d'hébergement, l'évaluation du statut sanitaire et la pesée des animaux pendant cette période seront précisés.
- la méthode utilisée pour enregistrer la consommation alimentaire et hydrique des animaux pendant 6 mois.
- fréquence, type d'observation et procédure en cas d'observation de signes cliniques, d'animaux moribonds ou morts (isolement, fréquence d'observation, nécropsie...)
- fréquence et type d'observation et procédure en cas de déviation de la normale lors des examens physiques et fonctionnels des rats.
- la collecte des échantillons et des tissus (nombre de rats par jour, procédure d'euthanasie, type de prélèvement, transport des animaux, pesée, conservation des échantillons, conditions de stockage...). En particulier, la procédure d'euthanasie devra tenir compte des spécificités de certains échantillons tels que les prélèvements de sang en vue de dosages hormonaux.
- les dispositions personnelles pour mener à bien les prélèvements : procédure, nombre de rats par jour, procédure de randomisation, étiquetage, identification des échantillons...
- procédure d'analyse en hématologie, analyse biochimique et histologie (volumes requis, durée, équipement...)
- procédure permettant d'assurer l'analyse en double aveugle et la traçabilité des échantillons
- étapes visant à réduire la variabilité et optimiser la qualité
- capacité du personnel à se former et acquérir de nouvelles techniques
- plan expérimental détaillé daté avec le nombre de personnes impliquées dans chaque étape
- plans de préparation et de compte-rendu de l'étude (forme, nombre et coût de ces étapes)
- une estimation détaillée des coûts pour 10 rats/sexe/régime/protocole et le coût total.

- Le soumissionnaire, dans son devoir de conseil, proposera toute solution à fin d'économie de temps et d'argent et permettant d'améliorer le protocole.

*Pendant la phase expérimentale, le candidat doit :*

- assurer le management des animaux, les prélèvements et relevé de données et une part des analyses
- noter tous les événements qui s'écartent des procédures décrites dans le présent cahier
- envoyer les échantillons dès la fin des prélèvements à T0, T90, T135 et T180
- faire un rapport préliminaire 3 mois après le début de l'expérimentation

*Après la phase expérimentale, le candidat doit :*

- faire une part des analyses
- écrire un rapport final
- envoyer les données brutes et des données historiques concernant d'autres études afin de vérifier les paramètres des rats témoins de l'étude

## 1.6 Limites de prestations

Les laboratoires membres du consortium analyseront des échantillons d'urine et sang, certains organes et d'autres données. Les échantillons et données seront préparés tel qu'il est indiqué (voir ci-après). Ces échantillons seront envoyés aux laboratoires du consortium (voir Annexe 2 pour les détails, les adresses des contacts seront données au commencement de l'étude). La personne référente est B Salles assisté de B Broux. Des changements mineurs peuvent être décidés dans le protocole avant le début de l'expérimentation.

## 2 DESCRIPTION DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

### 2.1 Animaux

#### 2.1.1 Espèce animale et souche

En vue de comparer les données avec les programmes européens GRACE et G-TwYST, nous utiliserons des rats Wistar Rcc Han / Specific Pathogen Free (SPF). Il est préconisé pour la comparaison entre les programmes que le fournisseur soit HARLAN.

#### 2.1.2 Nombre d'animaux

Sur la base du nombre de paramètres analysé et les besoins statistiques, le nombre d'animaux a été fixé à au moins 480 animaux divisé en 8 groupes de 30 mâles et 30 femelles chacun. Dix mâles et 10 femelles seront sacrifiés après 90 jours d'exposition (T90), et des échantillons seront recueillis à ce moment-là (groupe 1). Dix mâles et 10 femelles seront sacrifiés à T180, et des échantillons seront recueillis à T0, T90, T135 et T180 (groupe 2a). Les 10 mâles et 10 femelles restants seront sacrifiés à T180 mais le recueil des échantillons n'aura lieu qu'à ce moment-là (groupe 2b). Les femelles seront nullipares et non gestantes. Une étude sentinelle devra être planifiée et expliquée.

#### 2.1.3 Age et poids de départ

A l'arrivée, les animaux pèseront entre 100 et 120g et seront âgés de 5 semaines. Les animaux seront âgés de 6 semaines au début de l'étude et pèseront entre 110 et 140g. Idéalement, ils devront être nés le même jour  $\pm$  2 jours et être de poids

uniforme ( $\pm 20\%$  de la moyenne). Etant donné la répartition de l'échantillonnage et la nécessité de prélever de l'urine, du sang et des tissus, tous les animaux ne peuvent avoir le même T0.

#### 2.1.4 Identification des animaux

Au sein d'un même groupe, chaque rat sera identifié individuellement, idéalement par une micro puce dans l'oreille.

#### 2.1.5 Hébergement

Il est nécessaire de mettre 2 rats par cage et d'utiliser des pièces séparées pour les mâles et les femelles. Afin d'éviter les erreurs, nous demandons que les cages d'un même traitement soient regroupées verticalement sur le portoir et que le groupe de cages change régulièrement de place (une fois par semaine). Il y aura une rotation des cages au sein de chaque série verticale (même groupe de dose) du haut vers le bas. Une rotation des portoirs de cages sera également effectuée dans le sens des aiguilles d'une montre toutes les 2 semaines par rapport à la configuration originelle de la pièce. Un seul expérimentateur, toujours le même, sera en charge de ces rotations.

#### 2.1.6 Alimentation des rats

Les maïs ont été produits par le consortium, les analyses chimiques sont en cours et les croquettes seront fournies au CRO. La formulation est effectuée par un fabricant extérieur (mars 2015) et l'analyse chimique est opérée par le consortium. Les croquettes doivent être stockées à  $+4^{\circ}\text{C}$ . Un stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  serait un plus.

Durant la période d'acclimatation le CRO fournira une alimentation standard dépourvue d'OGM.

Après la période d'acclimatation (une semaine) 8 régimes seront comparés intégrant dans leur composition des maïs transgéniques ou contrôle (Figure 1)

*Figure 1: Description des groupes de rat selon le régime alimentaire*

group	Dose (% w/w feed)					No of animals	
	non GM isogenic 1	MON810	non GM isogenic 2	NK603	NK603+ glyphosate	male	female
1	33	0	0	0	0	30	30
2	22	11	0	0	0	30	30
3	0	33	0	0	0	30	30
4	0	0	33	0	0	30	30
5	0	0	22	11	0	30	30
6	0	0	0	33	0	30	30
7	0	0	22	0	11	30	30
8	0	0	0	0	33	30	30
<b>Total</b>						<b>240</b>	<b>240</b>

## 2.2 Design experimental

## Voir Figure 2

### 2.2.1 Ressources humaines

Les personnes impliquées dans ce projet devront être identifiées ainsi que leur rôle. Une des personnes du consortium réalisera une visite à chaque étape critique du protocole, avant et pendant son exécution.

### 2.2.2 Acclimatation

Après leur arrivée dans les installations, les rats seront acclimatés à leurs nouvelles conditions de vie. La nourriture (sans OGM) et l'eau seront distribuées *ad libitum*. Un échantillon de nourriture sera envoyé aux laboratoires d'analyse engagé pour les analyses de composition alimentaire.

### 2.2.3 Répartition des animaux dans les groupes

Avant le début de l'expérimentation à T0, les paramètres de l'étude détaillée de tous animaux sera effectuée. Les rats seront répartis dans les groupes expérimentaux au hasard. Avant le début de l'échantillonnage, les différences moyennes de poids entre les groupes (de même sexe) doivent être inférieures à 10%.

### 2.2.4 Traitement : régimes alimentaires

Après la répartition des rats dans les groupes, chaque groupe sera nourri avec l'un des 8 régimes. La nourriture et l'eau seront données *ad libitum*.

Les régimes sont codés en double aveugle par le fabricant. Les échantillons de régime envoyés pour l'expérimentation seront codés différemment des régimes eux-mêmes. La clé de codage est connue de la personne en charge du projet chez le fabricant et de Bernard Salles (contact du fabricant dans le consortium GMO90+). Cet encodage restera confidentiel et ne sera pas divulgué pendant l'expérimentation. Les régimes alimentaires seront encodés de 1 à 8 par le fabricant.

Un tableau récapitulatif sera communiqué. Des échantillons de chaque régime seront envoyés pour analyse par le laboratoire du consortium en charge de ces analyses.

## 2.3 Mesures et échantillons

### 2.3.1 Santé des animaux

L'état de santé des rats sera vérifié chaque jour et inclura :

- les changements au niveau de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, occurrence des excréments et sécrétions, changement du niveau d'activité ou de comportement
- morbidité ou mortalité
- signes cliniques
- évaluation fonctionnelle

De plus la consommation alimentaire et hydrique seront mesurées une fois par semaine pendant tout le traitement (6 mois) par cage (2 rats par cage)

Chaque animal devra être pesé à ces moments : 1) 48h après son arrivée, 2) le premier jour de traitement, 3) une fois par semaine pendant le traitement, 4) à la fin de l'étude, 5) en cas de mort prématurée ou sacrifice *in extremis*.

### 2.3.2 Collecte des échantillons

L'échantillonnage aura lieu à T0, T90, T135 et T180 durant le traitement (voir Figure 2).

L'échantillonnage sera réalisé sur la plus courte période possible. Les rats seront préalablement mis à jeun 3 à 4h avant.

Les échantillons comprennent du sang, de l'urine, des organes et els analyses incluent hématologie, chimie sanguine et urinaire, omiques, histologie et pathologie. Chaque type d'échantillon devra être prélevé au même moment de la journée pour chaque journée de prélèvement.

- Les échantillons de sang seront divisés pour l'hématologie, la chimie clinique et les omiques.
- Les échantillons d'urine seront collectés pour les omiques
- Les tissus et organes seront prélevés et analysés en histologie et omiques.

Dans chaque groupe de 30 animaux par sexe : 10 seront euthanasiés à T90 (groupe 1). Les 20 autres constitueront le groupe 2 et seront subdivisés en 2a et 2b, de 10 rats par sexe chacun.

L'échantillonnage se fera de la manière suivante :

Groupe 1 (10 rats/sexe/régime): à T90 : sang, urine, histologie et prélèvement des organes

Groupe 2a (10 rats/sexe/régime): à T0, T90 et T135 : sang, urine, et à T180 : sang, urine, histologie et prélèvement des organes

Groupe 2b (10 rats/sexe/régime): à T180 : sang, urine, histologie et prélèvement des organes

#### 2.3.2.1 Sang

Les échantillons de sang seront prélevés pour les omiques et les dosages hormonaux faits par le consortium et pour l'hématologie et la biochimie clinique faites par le soumissionnaire.

Pour le consortium : au moins 1 mL à T0 (ou 1.5 mL à T90 et T135 et 5 mL lors des mises à mort) seront collectés dans des tubes héparinés, centrifugés à 3000 g à 4°C pendant 15 minutes.

Pour chaque animal, après la collecte de sang dans un tube hépariné, les échantillons seront gardés moins de 15 minutes à 4°C avant centrifugation pour séparer les globules rouges du plasma. Le plasma sera aliquoté en tubes eppendorf de 500 µL en aliquots de 100 µL et le reste dans un dernier tube.

Le sang sera également collecté pour l'hématologie et la biochimie clinique avec un volume minimum.

Les aliquots seront conservés à -80°C et envoyés à l'INSERM U1124, U1149 à Paris, à Profilomic à Gif-sur-Yevtte et à l'INSERM IRSET U1085 à Rennes dans de la glace carbonique (Annexe 2).

#### 2.3.2.2 Urine

Les échantillons d'urine seront collectés pour des dosages hormonaux, des omiques et de la biochimie.

Les urines seront collectées sur 24h pour les animaux du groupe 2a. Après la collecte, les échantillons seront collectés dans des tubes de type Falcon de taille appropriée et stockés en aliquots d'1mL à -80°C. Pour le transport aux laboratoires du consortium Axiom (Toulouse), Laberca (Rennes) et l'INSERM U1149 (Paris), les échantillons seront emballés avec de la glace carbonique (Annexe 2).

#### 2.3.2.3 Organes pour les omics et l'histologie

Tous les organes listés dans l'annexe 1 (Gross necropsy) seront systématiquement prélevés, pesés et préparés pour la conservation. Un des membres de laboratoires du consortium viendra collecter les organes (hors analyse par le CRO) pour stockage (Annexe 2).



- Le **foie** doit être prélevé en premier. Il sera prélevé puis pesé. Le lobe latéral droit sera séparé, coupé en 3 morceaux de taille équivalente, 2 d'entre eux seront immédiatement congelés dans l'azote liquide, le 3<sup>e</sup> sera préparé pour une analyse histologique par le soumissionnaire. Les tissus seront préservés dans un fixateur (tampon neutre à 10% de formol) pour un examen histopathologique des lésions importantes. Quatre fragments de 50-100 mg seront disséqués au centre du grand lobe et placés dans des tubes de type eppendorf d'1.5 ou 2 mL, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C en attendant leur envoi à l'unité INSERM U1124 du consortium. Les échantillons pour l'extraction ARN seront traités en priorité, dans les 2 à 5 minutes suivant l'euthanasie, afin d'éviter la dégradation des ARN.
- Ensuite, les 2 **reins** seront prélevés et pesés. Le rein droit sera coupé transversalement en 2 parties de 150-250 mg pour la partie haute et le reste de la partie basse. La partie haute sera coupée transversalement en 2 parties équivalentes et les 3 morceaux (partie basse + les 2 parties de la section haute) seront identifiées et placées dans des tubes individuels d'1.5 ou 2 mL, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'envoi à l'INSERM U1149. Les échantillons seront stockés dans les tubes appropriés. La dissection des reins sera faite par la même personne pour l'homogénéité et la reproductibilité des résultats. Les échantillons pour l'extraction d'ARN seront traités en premier, dans les 3 à 5 minutes après l'euthanasie afin d'éviter la dégradation des ARN.

#### 2.3.2.4 *Organes uniquement pour l'histologie*

- **L'intestin** doit être prélevé rapidement après la mort. Une formation pour le prélèvement de cet organe sera effectuée par des membres du consortium. Deux types d'échantillons sont nécessaires et seront envoyés au laboratoire du consortium INRA Toxalim (Toulouse) :
  - Des échantillons de jéjunum et colon (1 cm, rincé avec du liquide physiologique), à congeler immédiatement après le sacrifice dans l'azote liquide. Ils seront utilisés pour du Western blot.
  - D'autres échantillons de jéjunum et colon (2 cm, rincé avec du liquide physiologique) traités ainsi :
    - Fixation avec du paraformaldéhyde 4% à 4°C pendant 4 à 6 heures selon la taille de l'échantillon
    - Imprégnation, 1h puis une nuit à 4°C dans une solution à 30% de sucrose. L'échantillon doit couler au fond du tube, ce qui indique une bonne imprégnation.
    - Congélation :
      - Remplir la cupule avec du Neg 50
      - Placer l'échantillon orienté dans la cupule pour la découpe
      - Placer en contact avec l'isopentane sans immerger
      - Lorsque le milieu devient blanc, immerger le tout dans l'isopentane
      - Congeler à -80°C

Un échantillon de chaque partie de l'intestin (duodenum, jéjunum, iléon, colon) sera gardé dans du tampon neutre à 10% de formol et subira un examen histopathologique.

Tout cela sera effectué par la même personne pour l'homogénéité et la reproductibilité.

**Testicules et ovaires :** une démonstration sera effectuée par des membres du consortium pour le prélèvement de ces organes. L'organe droit sera fixé dans du liquide de Bouin pendant 2 heures puis préparé en paraffine. L'organe gauche sera congelé à -

80°C. Ceci sera effectué par la même personne pour l'homogénéité et la reproductibilité.

**Epididymes :** Prélevés et congelés rapidement à -80°C. Une démonstration sera effectuée par des membres du consortium pour le prélèvement de ces organes. Ceci sera effectué par la même personne pour l'homogénéité et la reproductibilité.

Les organes suivants seront préparés pour l'histologie uniquement, l'analyse sera faite par le soumissionnaire : parties restantes du foie, rein gauche, estomac, surrénales et pancréas.

Les organes suivants seront préparés pour la conservation : des parties seront fixées dans du formol et le reste congelé à -80°C : parties restantes du foie, cœur, poumons, rate, pancréas, utérus, vagin, vessie, estomac, parties restantes de l'intestin, surrénales, thymus, cerveau, thyroïde, glandes parathyroïdes, sternum avec moelle osseuse.

Figure 2 : design expérimental de l'étude

régime diet	variété non OGM 1 (MON 810) non GMO variety 1	MON 810	variété non OGM 2 (NK 603) non GMO variety 2	NK 603	NK 603 + glyphosate	groupe group	nb rats(M+F) rat number	régime témoin, sans OGM control diet without GMO		traitement : régimes maïs OGM / non OGM treatment: GMO maize / non GMO maize			
								sevrage weaning		T0	T90	T135	T180
								âge des rats rat's age	21j 21d				
1	33%					1	20	acclimatation acclimatization	sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
							20			sang*, urine sang*, urine sang*, urine sacrifice			
							20			sang*, urine sacrifice			
2	22%	11%				1	20	acclimatation acclimatization	sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
							20			sang*, urine sang*, urine sang*, urine sacrifice			
							20			sang*, urine sacrifice			
3		33%				1	20	acclimatation acclimatization	sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
							20			sang*, urine sang*, urine sang*, urine sacrifice			
							20			sang*, urine sacrifice			
4			33%			1	20	acclimatation acclimatization	sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
							20			sang*, urine sang*, urine sang*, urine sacrifice			
							20			sang*, urine sacrifice			
5			22%	11%		1	20	acclimatation acclimatization	sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
							20			sang*, urine sang*, urine sang*, urine sacrifice			
							20			sang*, urine sacrifice			
6				33%		1	20	acclimatation acclimatization	sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
							20			sang*, urine sang*, urine sang*, urine sacrifice			
							20			sang*, urine sacrifice			
7			22%		11%	1	20	acclimatation acclimatization	sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
							20			sang*, urine sang*, urine sang*, urine sacrifice			
							20			sang*, urine sacrifice			
8					33%	1	20	acclimatation acclimatization	sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
							20			sang*, urine sang*, urine sang*, urine sacrifice			
							20			sang*, urine sacrifice			
						tous all rats			Suivi hebdomadaire : poids vif, consommation alimentaire et eau weekly: live weight, feed and water consumption				
								Suivi quotidien : état santé daily: health status					

prélèvements sampling

Les Temps (T0, T90, T135 et T 180) sont le nombre de jour par rapport à l'introduction des régimes expérimentaux.

\*"sang" is blood

## 2.4 Réception

Tous les échantillons seront envoyés selon les instructions de l'Annexe 2. Les échantillons biologiques seront envoyés avec de la glace carbonique et tous les aliquots ne seront pas envoyés en même temps.

Les données brutes seront transmises en utilisant le masque établi par l'équipe en charge des statistiques du projet.

Un compte-rendu intermédiaire sera fourni 3 mois après le début de l'expérimentation et le rapport final est attendu dans les 10 mois (à partir de T0).

All the samples will be sent according to the table in Annexe 2. Biological samples will be sent under dry ice and all aliquots will not be sent at the same time.

The raw data will be given using the data entry form produced by the statistical work package of the project.

A report at 3 months will be written and the final report is expected before 10 months (from T0).

## 2.5 Obligation de résultats

### Garantie sur l'obligation de résultat

Selon l'offre de base demandée au présent CCTP en article 1.5, le soumissionnaire doit décrire dans l'offre les garanties pour obtenir les données et échantillons pour au moins 10 rats par sexe et par régime, dans les conditions décrites précédemment et en accord avec le plan expérimental (Figure 2).

### OPTION 1 :

Pour être certain de disposer de Rats par condition expérimentale la proposition de, 12 rats/sexe/régime pour l'échantillonnage à six mois peut être acceptée et en ce cas un second chiffrage du coût global sera mentionné en option 1.

Tout résultat par groupe de 10 ou 12 rats/sexe/régime ne correspondant pas aux attentes du pouvoir adjudicateur telles que décrites dans le CCTP seront repris aux frais du Titulaire du marché.

## Annexe 1: Détail des analyses effectuées par le Centre de Recherche Opérationnel

### *Statut sanitaire de l'animal*

Changement sur la peau – fourrure – yeux – muqueuses – sécrétions et excréments – niveau d'activité – changement de comportement – morbidité et mortalité – signes cliniques – évaluation fonctionnelle – consommation alimentaire et hydrique – poids vif

### *Hématologie*

numération globules rouges (GR) - indice de distribution des globules rouges (IDR)- Hématocrite (Hct) - teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) - concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) - Volume globulaire moyen (VGM) – numération des réticulocytes – numération des leucocytes - Numération monocytes (Mon) – numération des plaquettes (PLT) – temps de coagulation - temps de céphaline activée

### *Biochimie clinique (sang)*

Les paramètres incluront : protéines totales, albumine, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase, alcaline phosphatase, gamma glutamyl transférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires, créatinine, urée, glucose à jeun, bilirubine totale, cholestérol total, triglycérides, ions (Na, K, Ca, Cl, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), inhibine B

### *Paramètres urinaires*

Volume d'urine (24h) – apparence – hématurie – osmolarité ou conductivité – pH – glucose – volume de glucose urinaire – gravité spécifique

### *Pathologie*

Organes et tissus conservés dans un tampon neutre à 10% de formol pour une évaluation histopathologique. Un examen microscopique complet des organes listés au paragraphe 2.3.2.4. sera effectué en accord avec les lignes directrices OCDE 408 sur tous les animaux de tous les groupes.

### *Nécropsie*

Une nécropsie complète sera effectuée sur tous les animaux à T90 et T180. Le poids des organes sera enregistré en accord avec les lignes directrices OCDE 408 et les organes subiront un examen macroscopique pour détecter une déviation par rapport à la normale. Une formation sera effectuée pour certains prélèvements (épididymes, ovaires, testicules, vésicules séminales, prostate, intestin) par des membres du consortium.

Le poids de chaque animal sera enregistré avant euthanasie. Le poids des organes suivants sera enregistré : foie, cœur, poumons, reins, rate, pancréas, testicules, utérus, ovaires, vagin, vessie, épидидymes, intestin, surrénales, thymus, cerveau, thyroïde, glandes parathyroïdes et sternum avec moelle osseuse.

La partie antérieure de la prostate et les vésicules séminales seront pesées : une démonstration sera faite par le groupe INSERM de Rennes.

Une évaluation histologique d'échantillons de tissus sera faite sur chaque animal.

Des investigations plus poussées pourront être faites en cas de détection d'anomalie sur les tissus.

Tous les organes et tissus susceptibles d'être considérés comme des organes cibles seront conservés.

Des parties spécifiques de certains organes seront congelés dans de l'azote liquide pour des examens postérieurs.

### *Histopathologie*

Les organes et tissus préservés dans du tampon neutre à 10% de formol subiront un examen histopathologique. Un examen microscopique complet des organes suivants sera effectué en accord avec les lignes directrices OCDE 408 sur tous les animaux de tous les groupes : foie, reins, testicules, ovaires, estomac, intestin (duodénum, jéjunum, iléon, colon), surrénales, pancréas

### *Analyse des données*

Les analyses statistiques seront réalisées par l'équipe statistique (lots 3 et 5). Tout d'abord, les données seront vérifiées afin de détecter des erreurs évidentes et des données aberrantes. Les données aberrantes seront vérifiées avec les enregistrements originaux. Les données aberrantes qui ne sont pas dues à des erreurs de transcription ou autre erreur évidente seront incluses mais signalées.

Les données cliniques et les annotations correspondantes seront transmises en utilisant le masque donné par l'équipe statistique du projet.

Des données historiques de groupes contrôles d'études précédentes seront fournies afin de vérifier que les données des groupes contrôle de la présente étude sont dans un intervalle normal.

## Annexe 2: Récapitulatif des échantillons et de leur destination (2 pages)

échantillon	catégorie de l'échantillon	type d'échantillon	moment du prélèvement	analyse	groupes de rats	nombre de rats	nombre d'échantillons envoyés	volume minimum requis/rat	conditions envoi	moment de l'envoi	destination
sample	sample category	sample type	sampling time	analysis	rats group	number of rats	number of samples	minimum volume/rat	sending conditions	time of sending	destination/recipient
plasma	blood biochemistry	raw data	T0, T90, T135, T180	CRO	all	480	960		e-mail	after T180	Bernard Salles, INRA T
plasma	omics	tubes	T0, T90, T135, T180	Profilomic	2a	160	640	0.1 mL	dry ice	after each sampling	Profilomic, Gif-sur-Yve
plasma	hormonal assays	tubes	T90, T180	INSERM IRSE	1;2a	320	960	0.3 mL	dry ice	after T180	INSERM IRSET U1085, R
plasma	blood biochemistry	tubes	T90, T180	Inserm U114	1;2a	320	320	0.1 mL	dry ice	after T180	Inserm U1149, Paris
plasma	reserve	tubes	T0, T90, T135, T180		all	480	X		dry ice	after T180	Inserm U1124, Paris
blood	haematology	raw data	T0, T90, T135, T180	CRO	all	480	960		e-mail	after T180	Bernard Salles, INRA T
rat individual data		raw data	from reception to sacrifice	CRO	all	480	480		e-mail	after each sampling	Bernard Salles, INRA T
feed & water consum	feeding	raw data	from reception to sacrifice	CRO	all	480	X		e-mail	after T180	Bernard Salles, INRA T
rats growth	growth	raw data	from reception to sacrifice	CRO	all	480	X		e-mail	after each sampling	Bernard Salles, INRA T
organs weight	growth	raw data	T90, T180	CRO	all	480	X		e-mail	after each sampling	Bernard Salles, INRA T
liver sections	histopathology	slides/pictur	T90, T180	CRO	all	480	X			after T180	Bernard Salles, INRA T
liver samples	omics	tubes	T90, T180	Inserm U112	1;2a	320	960	50-100 mg*3	dry ice	after each sampling	Inserm U1124, Paris
liver samples (edge	reserve	tubes	T90, T180		1;2a	320	X		dry ice	after T180	Inserm U1124, Paris
intestine sections	histopathology	slides/pictur	T90, T180			480	X			after T180	INRA Toxalim, Toulous
colon samples	biochemistry	tubes	T90, T180		1;2a	320	640		dry ice	after each sampling	INRA Toxalim, Toulous
jejunum samples	biochemistry	tubes	T90, T180		1;2a	320	640		dry ice	after each sampling	INRA Toxalim, Toulous
upper quarter of the	omics	tubes	T90, T180	Inserm U112	1;2a	320	320	50-100 mg	dry ice	after each sampling	Inserm U1124, Paris
other upper quarter	reserve	tubes	T180		2b	160	160		dry ice	after T180	Inserm U1124, Paris
other 3 quarters of t	reserve	tubes	T90, T180		all	480	1440		dry ice	after T180	Inserm U1124, Paris
half left kidney	histopathology	slides/pictur	T90, T180	CRO/Inserm	1;2a	320	X			after T180	Inserm U1149, Paris Bernard Salles, INRA Toxalim, Toulouse
half left kidney	reserve	slides/pictur	T180		2b	160	X			after T180	Bernard Salles, INRA T
other half left kidne	biochemistry	tubes	T90, T180	Inserm U1149, Paris	1;2a	320	320		dry ice	after T180	Inserm U1149, Paris
other half left kidne	reserve	tubes	T180		2b	160	160		dry ice	after T180	Bernard Salles, INRA T
right ovary	histopathology	slides/pictur	T90, T180	CRO/IRSET-I	all	240	X			after T180	IRSET-INSERM U1085, Rennes Bernard Salles, INRA Toxalim, Toulouse
left ovary	hormonal assays	tubes	T90, T180	IRSET-INSER	1;2a	160	160		dry ice	after T180	IRSET-INSERM U1085, F
left ovary	reserve	tubes	T180		2b	80	80		dry ice	after T180	Bernard Salles, INRA T
right testis	histopathology	slides/pictur	T90, T180	CRO/IRSET-I	all	240	X			after T180	IRSET-INSERM U1085, Rennes Bernard Salles, INRA Toxalim, Toulouse
left testis	hormonal assays	tubes	T90, T180	IRSET-INSER	1;2a	160	160		dry ice	after T180	IRSET-INSERM U1085, F
left testis	reserve	tubes	T180		2b	80	80		dry ice	after T180	Bernard Salles, INRA T
epididymides		tubes	T90, T180	IRSET-INSER	1;2a	160	320		dry ice	after T180	IRSET-INSERM U1085, F
epididymides	reserve	tubes	T180		2b	80	160		dry ice	after T180	Bernard Salles, INRA T

échantillon	catégorie de l'échantillon	type d'échantillon	moment du prélèvement	analyse	groupes de rats	nombre de rats	nombre d'échantillons envoyés	volume minimum requis/rat	conditions envoi	moment de l'envoi	destination	
sample	sample category	sample type	sampling time	analysis	rats group	number of rats	number of samples	minimum volume/rat	sending conditions	time of sending	destination/recipient	
heart	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
spleen	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
pancreas	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
uterus	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
vagina	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
urinary bladder	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
stomach	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
gut	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
adrenals	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
thymus	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
brain	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
thyroid gland	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
parathyroid glands	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
sternum with bone	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
one lung	reserve histopathology		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
heart	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
the other lung	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
spleen	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
pancreas	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
uterus	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
vagina	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
urinary bladder	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
stomach	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
gut	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
adrenals	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
thymus	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
brain	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
thyroid gland	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
parathyroid glands	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
sternum with bone	reserve frozen		T90, T180		all	480	X				Bernard Salles, INRA Tr	
urine	urine biochemistry	raw data	T0, T90, T135, T180	CRO	all	480	X		e-mail	after each sampling	Bernard Salles, INRA Tr	
urine	omics	tubes	T0, T90, T135, T180	INRA Toxalim	2a	160		640	1 mL	dry ice	after each sampling	INRA Toxalim AXIOM,
urine	urine biochemistry	tubes	T90, T180	Inserm U1149, Paris	1;2a	320		640	0.5 mL	dry ice	after T180	Inserm U1149, Paris
urine	reserve	tubes	T0, T90, T135, T180		all	480	X			dry ice	after T180	Bernard Salles, INRA Tr
urine	hormonal assays	tubes	T0, T90, T180	LABERCA, Nantes	2a	160		480	1 mL	dry ice	after T180	LABERCA, Nantes
hematuria	urine biochemistry	raw data		Inserm U1149, Paris	1;2a	320		320	0.02 mL	e-mail	after T180	Inserm U1149, Paris
hematuria	urine biochemistry	raw data	T180	CRO	2b	160		160	0.02 mL	e-mail	after T180	Inserm U1149, Paris



