

Recherche de biomarqueurs prédictifs d'effets biologiques dans l'étude de la toxicité sub-chronique des OGM chez le rat.

Version de février 2015

Mots-clés: Maïs OGM, glyphosate, omiques, test rongeurs à 90 jours, (epi)genomique, biomarqueurs, predictivité, préoccupation sociale

Thème de l'appel d'offre: toxicologie y compris protéomique et métabolomique et analyse par la biologie des systèmes (animaux de laboratoire ou de rente)

Résumé du projet de recherche et résultats attendus en termes d'apports à l'action publique

Le projet GMO^{90plus} a pour finalité de déterminer si l'alimentation de rats avec des maïs génétiquement modifiés induit des changements métaboliques qui pourraient être reliés à des biomarqueurs précoces d'effets (caractéristique biologique mesurable) en s'appuyant sur des concepts et des technologies les plus avancées. Ainsi, avec les outils de la biologie des systèmes et l'emploi des "omiques" il est désormais possible de mettre en évidence des marqueurs d'exposition dans le sang, l'urine ou les tissus. Cependant les variations de marqueurs biologiques doivent être reliés à des phénomènes physiopathologiques pour avoir une valeur prédictive et être utilisés comme marqueurs d'effets.

GMO^{90plus} est unique car il réunit des compétences scientifiques variées dans le domaine de la production végétale et la caractérisation analytique, la biologie des systèmes, la toxicologie classique, les statistiques et la modélisation ainsi que les sciences humaines et sociales. Ce projet regroupe des chercheurs de l'Inra, l'Inserm, l'Anses ainsi que des partenaires spécialisés en statistique, modélisation, protéomique et bioinformatique. Des appels d'offre seront lancés prochainement pour couvrir les domaines de l'expérimentation animale ainsi que certaines analyses sur la composition et les contaminants présents dans les aliments contenant ou non des OGM.

Les plantes génétiquement modifiées (PGM) qui seront étudiés dans le cadre de ce programme sont les maïs MON810, qui exprime la protéine insecticide *Bacillus thuringiensis* (toxine Bt), et NK603, résistant à l'herbicide glyphosate. Le choix de ces 2 maïs PGM est principalement justifié par une volonté de cohérence avec des programmes de recherche européens en vue de comparer nos résultats respectifs. En effet, ces travaux (GMSAFOOD 2012, GRACE 2015, Marlon 2015, G-TwYST 2017) suivent différentes approches expérimentales chez le rat, le poisson, le porc... pour tester l'hypothèse d'un effet sur la santé suite à une exposition à long terme.

Des rats des deux sexes seront suivis pendant une durée de six mois au cours desquels des échantillons d'urine et de sang seront prélevés à intervalles réguliers pour la recherche de biomarqueurs par des techniques "omiques" à haut-débit. Les résultats seront analysés par des spécialistes de physio-pathologie avec une orientation vers les systèmes hépato-gastro-intestinal, reproducteur et urinaire et des biostatisticiens. La caractérisation et la validation de biomarqueurs d'intérêt seront examinées par le consortium GMO^{90plus} en étroite relation avec les coordinateurs des deux projets européens (GRACE et G-TwYST) qui suivent des rats sur 1 et 2 ans, la même souche de rat ayant été choisie, encore une fois dans une démarche de cohérence et de complémentarité des programmes de recherche. La validation des biomarqueurs sera notamment assurée grâce à l'analyse d'échantillons du projet G-TwYST.

En outre, le débat sociétal sur la question de l'impact environnemental et sanitaire des organismes génétiquement modifiés (OGM) et plus spécifiquement des PGM a été relancé suite à la parution puis au retrait de l'étude menée par l'équipe de G.E. Seralini (Seralini *et al.*, 2012). Le projet

GMO^{90plus} s'inscrit donc dans une volonté de dialogue avec dans un premier temps la constitution d'une "instance de dialogue" qui n'a pu fonctionner suite à la défection dès le début de la première réunion d'une des parties. Notre politique de transparence dans notre fonctionnement et restitution des données expérimentales utilisera d'autres canaux et de plus les données expérimentales seront disponibles en accès libre sur un site partagé avec les collègues des 3 projets européens GRACE, G-TwYST et MARLON.

CONSORTIUM : Anses, Toxicologie alimentaire (INRA UMR 1331, associé INP et Université de Toulouse), Reproduction et développement des plantes (INRA-CNRS-ENS UMR879), Mycologie et Sécurité des Aliments (INRA UR1264), Biologie du fruit et pathologie (INRA UMR1332, associé Université de Bordeaux), Pharmacologie, Toxicologie et Signalisation Cellulaire (Inserm U747, associé Université Paris Descartes), Immunopathologie rénale (Inserm U699, associé Université Paris 7 Diderot), IRSET (Inserm U625 et Inserm U1085), Institut de Mathématique de Toulouse (CNRS UMR 5219, associé Université de Toulouse 3), Methodomics, Profilomic, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (ONIRIS).

Responsable scientifique : Bernard SALLES, DVM, Pharm-D, PhD
 Professeur de Toxicologie (Faculté de Pharmacie)
 Directeur de l'unité Toxalim, INRA UMR1331
<http://www.toulouse.inra.fr/toxalim>

Budget total : 3 695 k€
 Montant du soutien financier demandé: 2 510 k€
 Durée : 3 ans

Sommaire

1. Présentation du projet.....	4
1.1. Contexte	4
1.2. Plan de recherche	6
1.3. Résultats attendus.....	8
1.4. Aspects innovants	8
2. Description des activités.....	10
2.1. Organisation	10
2.2. LOT 1 – Management, coordination et information (INRA Toxalim).....	10
3. Les lots relatifs au travail scientifique.....	16
3.1. LOT 2 : Production et caractérisation des aliments (INRA MycSA).....	16
3.2. LOT 3 – Outils statistiques et informatiques (Toxalim, INRA)	24
3.3. LOT 4: Effets des formulations sur les tissus, hormones et fonctions (Toxalim, Inra) 30	
3.4. LOT 5: identification par omiques de biomarqueurs physiopathologiques et d'exposition OMI-OGM90 + (Inserm UMR-S 747 Université Paris Descartes).....	40
4. Récapitulatif du plan expérimental et proposition d'extension.....	49
4.1. Production de maïs.....	49
4.2. Expérimentation animale et analyse des données.....	49
4.3. Proposition d'extension de l'expérimentation	51
Annexe 1	53
Annexe 2	55
Annexe 3	59
Annexe 4	61
Annexe 5	63

Recherche de biomarqueurs prédictifs d'effets biologiques dans l'étude de la toxicité sub-chronique des OGM chez le rat.

1. Présentation du projet

1.1. Contexte

Depuis la publication sur la première transformation du tabac (Fraley et al 1983), des efforts internationaux ont été développés pour établir des stratégies d'évaluation harmonisées pour la sécurité alimentaire ainsi que pour celle de l'environnement (Kuiper et al 2001). Les risques liés à l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM) sont traditionnellement évalués en combinant l'identification des dangers et l'estimation de l'exposition afin d'appuyer la prise de décision par les autorités compétentes. Les plantes génétiquement modifiées (PGM) possèdent des caractéristiques agronomiques améliorées, comme la résistance aux insectes et autres ravageurs, la tolérance aux herbicides, l'amélioration de la productivité et/ou la qualité et/ou d'autres caractéristiques qui ne sont pas présentes en l'absence de la modification génétique (Garcia-Canas et al 2011; Gong et Wang 2013; Kuiper et al 2003). Les modifications génétiques, bien qu'induisant des caractéristiques souhaitées peuvent entraîner des modifications inattendues des végétaux (Batista et al 2008; Riccio et al 2011), dont l'existence ainsi que l'impact potentiel sur l'environnement et/ou la santé humaine reste un sujet de controverse persistant (Codex Alimentarius 2009; EC 2013; König et al 2004). Ces controverses sont particulièrement alimentées par l'absence ou la faiblesse des données produites par la recherche publique sur les effets potentiels des PGM sur la santé à long terme. Cependant, des études à moyen terme (étude 90 jours) sont nombreuses du fait de la préconisation en Europe de tels tests pour l'évaluation préalable de chaque événement primaire de transformation. Le protocole de ces études a été discuté dans diverses instances, y compris à l'EFSA (ANSES 2011; EFSA 2008; 2009; 2011).

Toutefois le caractère « sentinelle » de ces études 90j et donc de leur capacité à prédire des effets susceptibles de survenir à plus long terme est débattu (Chassy 2010; Séralini et al 2012; Snell et al 2012). Des études illustrant le caractère «sentinelle» des études 90j comme celles de Betton (Betton et al, 1994) qui comparent les résultats à 90 jours et à deux années, indiquent que 70% des effets observés après deux ans sont déjà prévisibles à 90 jours.

Toutefois ces travaux, conduits par l'industrie pharmaceutique, sont peu nombreux et portent sur des substances chimiques et non sur des aliments. Or, la toxicologie des produits alimentaires et plus particulièrement des produits OGM comporte des spécificités. D'une part, l'aliment est une matrice complexe composée non pas par une, mais par des centaines de milliers de substances, et d'autre part, la dose administrable est limitée par les capacités d'ingestion de l'animal et ses besoins nutritionnels spécifiques.

Par ailleurs, la pertinence des modèles animaux et des protocoles expérimentaux utilisés dans ces études pose question au regard des exemples récents dans le domaine des substances chimiques actives sur le système endocrinien indiquant de possibles failles du concept de proportionnalité entre la dose et l'effet (cette relation peut être non monotone, par exemple en U inversé) (Calabrese et Blain 2011).

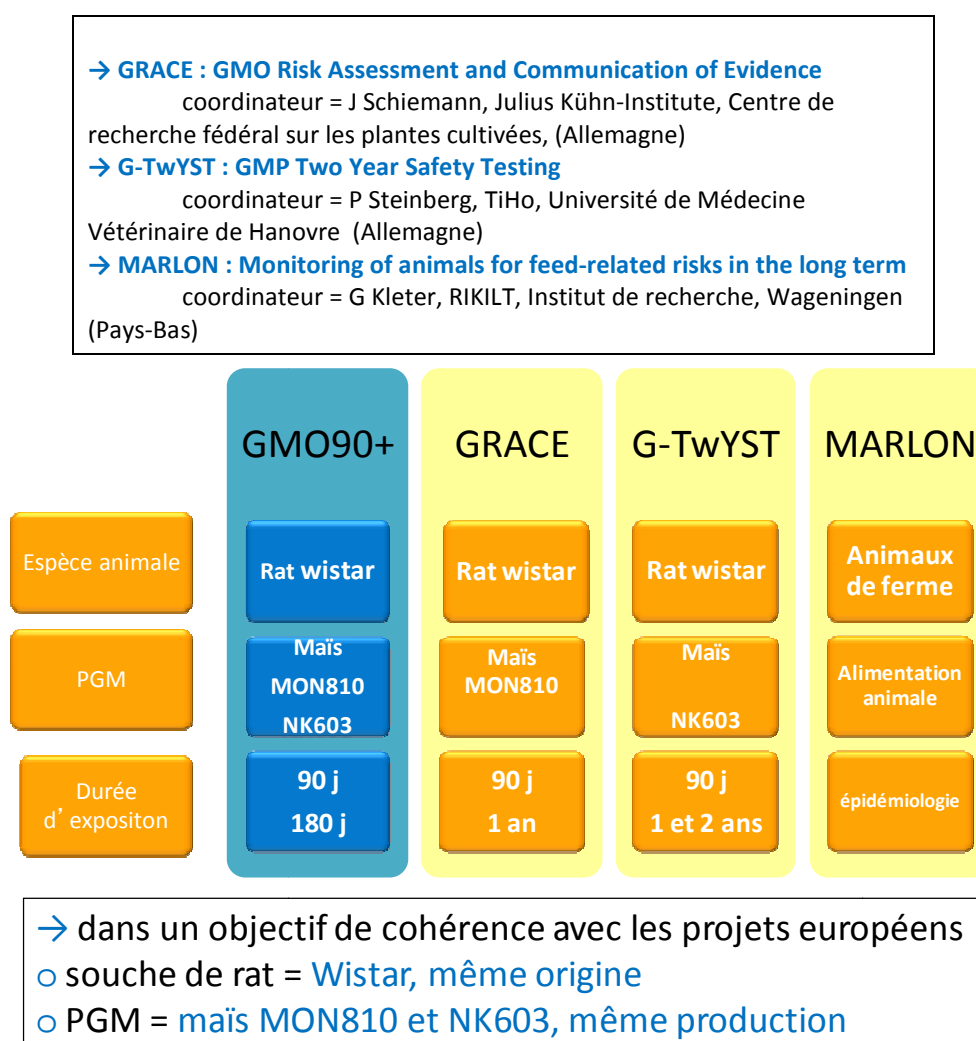
Dans ce contexte, le présent consortium propose de rechercher, d'identifier et de valider des biomarqueurs d'effets en exploitant les concepts et les technologies les plus avancées. Ces changements impliquent de tenir compte des avancées les plus récentes dans les tests biologiques et physiologiques et l'analyse des systèmes. Sur la base de ces progrès, **le consortium vise à identifier des biomarqueurs précoces de toxicité pertinents en ce qui concerne l'exposition aux maïs OGM.**

Notre projet mènera une étude 90j étendue à 6 mois (pour surveiller l'apparition d'effets ultérieurs) sur des groupes d'animaux nourris avec une PGM comparés à des groupes d'animaux témoins négatifs (animaux nourris avec des plantes témoins génétiquement proches non-OGM). Notre projet de recherche n'est pas destiné à évaluer les risques pour la santé associés à la consommation d'une PGM spécifique, évaluation qui relève de la responsabilité des agences de santé publique. Notre projet est en lien étroit avec les programmes européens GRACE et G-TwYST (Figure 1).

L'approche que nous suivons, à savoir l'exploration de nouveaux paramètres de suivi des animaux au cours de l'essai 90j permettra de faire émerger des variations entre les groupes. Notre rôle en tant que biostatisticiens, biologistes, toxicologues, sociologues est d'identifier les modifications réellement prédictives d'effets indésirables à plus long terme qui pourraient ainsi servir de biomarqueurs précoces de toxicité.

Le consortium souligne l'intérêt des études sur des durées plus longues conduites par ailleurs afin de confirmer le caractère prédictif des biomarqueurs identifiés dans le cadre de ce projet. Par conséquent, nos propositions sont complémentaires et cohérentes avec les autres initiatives européennes, qui nous permettront de compléter les acquis des projets existants en y intégrant des explorations et des objets de recherche qui ne figurent pas dans ces études sur les biomarqueurs. Des contacts fructueux ont été établis avec les leaders des trois projets européens en cours sur les PGM, GRACE, G-TwYST et MARLON (7e PCRD; voir Annexe 1).

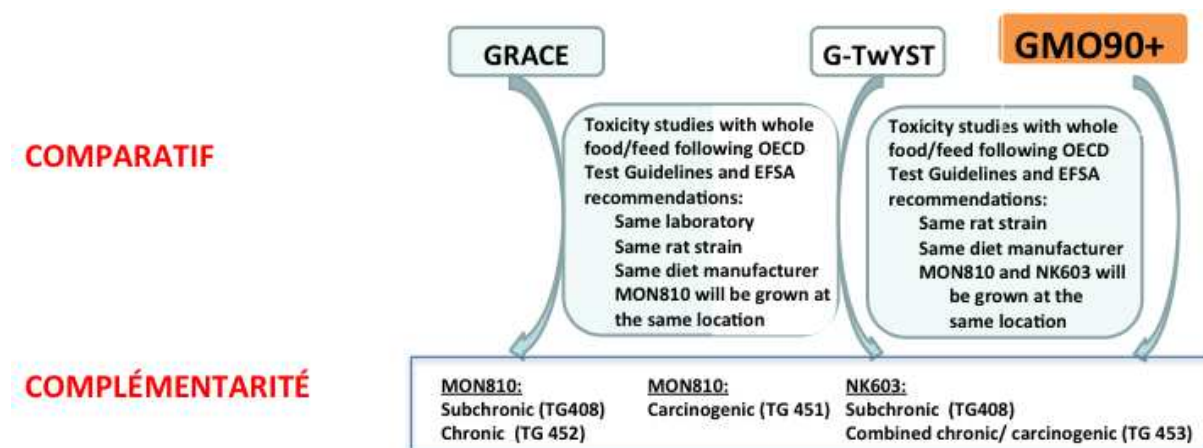
Figure 1 : Connexions avec les projets européens



En particulier le projet G-TwYST coordonné par P Steinberg a pour objet une étude de cancérogénicité du maïs NK603 (11 et 33%) administré pendant deux ans dans l'alimentation de rats (Figure 1, Figure 2) issu d'une récolte avec ou sans traitement par le glyphosate. Une réunion organisée par J Schiemann entre des responsables de lots du programme GRACE et les collègues participant au groupe "europe" s'est tenue les 18 et 19 février 2014 à Berlin au JKI. Nous avons aussi assisté à la réunion organisée par le programme GRACE à destination des parties prenantes qui s'est tenue à Bruxelles les 19 et 20 mai.

Nos trois collègues coordinateurs des projets européens sont membres du «conseil consultatif scientifique et stratégique" de notre projet.

Figure 2 : Connexions avec les projets européens



Notre objectif commun est de fournir des éléments scientifiques solides et apporter de la rationalité dans un débat déchiré trop longtemps entre des intérêts économiques et politiques.

1.2. Plan de recherche

- Nous avons programmé une étude 90 jours chez le rat **étendue** à 6 mois (pour surveiller l'apparition d'effets ultérieurs) sur des groupes d'animaux nourris avec une PGM comparés à des groupes d'animaux témoins négatifs (animaux nourris avec des plantes témoins génétiquement proches non-OGM)
- Le projet de recherche **n'est pas destiné à évaluer les risques pour la santé** associés à la consommation d'une PGM spécifique, évaluation qui relève de la responsabilité des agences de santé publique
- Notre approche consiste à explorer de nouveaux paramètres de suivi des animaux sur 6 mois grâce aux outils « omiques »

Notre consortium réunit des scientifiques issus de divers établissements de recherche, d'agences et d'entreprises privées (essentiellement des entreprises de biostatistiques à l'interface mathématiques-biologie, de « omiques » et de manière générale en dehors du champ des PGM) avec pour objet de proposer des pistes d'amélioration de la prédictivité des essais réglementaires subchroniques (essais à 90 jours) en prenant en compte de nouvelles données, issues des technologies omiques et de la biologie des systèmes. Un intérêt particulier sera porté aux organes

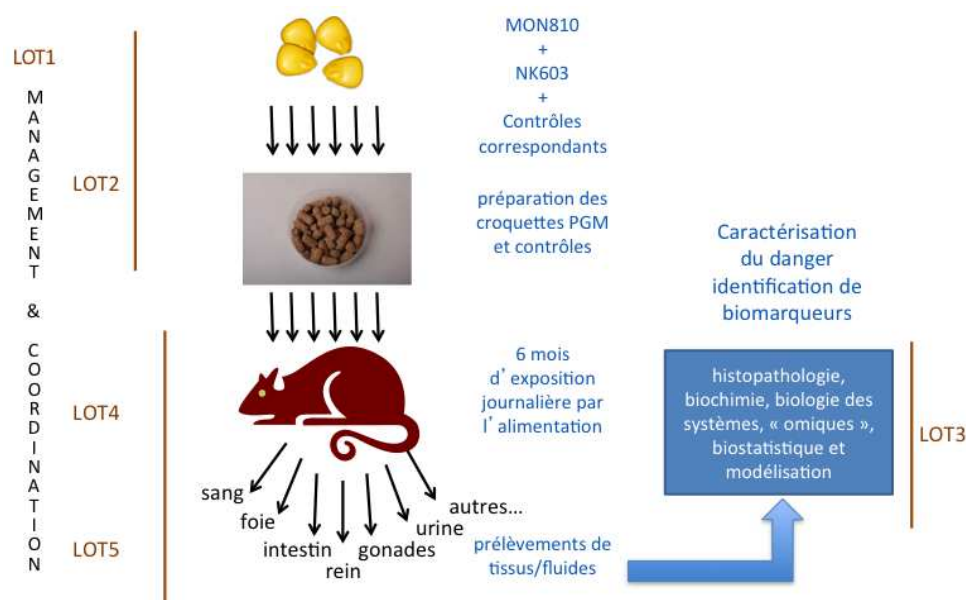
majeurs exposés aux aliments soit la sphère hépato-gastro-intestinale et uro-génitale et les dysfonctionnements potentiels relevant en particulier de perturbations hormonales et métaboliques.

La recherche sur les interactions bactérie-hôte a montré l'influence des bactéries intestinales sur la physiologie de l'hôte. Par conséquent, tout effet qu'une plante PGM pourrait produire sur le microbiome intestinal pourrait potentiellement affecter l'hôte. Les lignes directrices de l'EFSA concernant les essais aliments GM pour animaux, recommandent l'étude des effets sur l'hôte ainsi que sur les populations bactériennes de l'hôte. Cependant, les quelques rapports qui à ce jour ont examiné l'impact du maïs MON810 sur les bactéries, ont produit des résultats négatifs (Buzoianu et al 2012; Xu et al 2011; Yuan et al 2013). C'est pourquoi les expériences sur le microbiome ne seront pas prises en compte dans ce projet en raison des résultats publiés et du coût d'une telle analyse.

Pour promouvoir la comparabilité entre les études et l'échange de données de recherche, nous avons choisi l'espèce animale, discuté des plans expérimentaux et des OGM testés conformément aux rapports de l'EFSA et de l'Anses (ANSES 2011; EFSA 2009) et en cohérence avec les études à long terme citées ci-dessus. Ainsi, les rats seront exposés pendant une période de 6 mois au MON 810 (toxine au Bt) (Mendelsohn et al 2003) et NK603 (résistance au glyphosate). Les modèles expérimentaux sont affinés par des biostatisticiens, en coopération avec des biologistes, afin de proposer protocole d'étude optimal (puissance, taille de l'effet, nombre et taille des groupes ...) en rapport avec les objectifs spécifiques de cette étude (Fig. 3).

Plusieurs réunions téléphoniques ou présentesielles (Paris les 27/01/14, 27/02 et 5/05) ont été programmées afin de définir le protocole expérimental adapté à la question posée en présence des responsables de Lots, de représentants de l'ANSES de participants aux projets GRACE et MARLON. **D'autre part le "kick off" meeting s'est tenu le 28/02/14** dans la salle de réunion du MEDDE en présence des coordinateurs des programmes Marlon, G-TwYST et GRACE et d'une représentante du programme GMSAFOOD.

Figure 3 : Schéma expérimental



1.3. Résultats attendus

Dans le cadre de cette recherche, nous observerons et analyserons des variations de biomarqueurs relatifs à un différentiel d'exposition selon les régimes alimentaires et évaluerons la pertinence de biomarqueurs précoces de toxicité. Les résultats seront dans la mesure du possible comparés à ceux des programmes GRACE et G-TwYST.

Sur le plan de la toxicologie en France, ce projet permettra de renforcer les liens entre des toxicologues avec des compétences variées allant du "design expérimental" jusqu'à l'expression génétique en passant par la physiologie animale.

L'interaction public-privé est génératrice d'emplois nouveaux dans ce champ de l'interface mathématiques-biologie.

Sur le plan sociétal nous proposons l'établissement d'échanges réguliers avec les différents acteurs de la société civile qui permettront d'explicitier les objectifs de cette étude, les difficultés rencontrées, les résultats attendus et leurs limites pour mieux répondre aux attentes des parties prenantes, favorisant ainsi une meilleure compréhension du processus de recherche.

1.4. Aspects innovants

Dans le contexte de l'alimentation avec des plantes PGM, il y a un grand intérêt pour l'utilisation de techniques « omiques » (Davies 2009; Fonseca et al 2012; Houston et al 2011; Natarajan et al 2009) principalement dans des expériences à court terme comme les tests 90j. Mais la plupart des expériences menées ont, à ce jour, donné des résultats négatifs. Bien que quelques études aient porté sur l'analyse protéomique (Fonseca et al 2012; Houston et al 2011; Malatesta et al 2008; Natarajan et al 2009), il n'y a pas à notre connaissance d'études qui explorent conjointement par les technologies « omiques » les variations du transcriptome, protéome et métabolome, après une exposition de 6 mois à une PGM.

Une autre innovation devrait concerner une adaptation de dosages de métabolites en conjuguant les données expérimentales issues de la RMN et de la spectrométrie de masse. En outre, nous prévoyons une amélioration dans l'analyse des spectres RMN due à l'utilisation de statistiques avec un nouveau logiciel informatique performant.

À notre avis, l'innovation sera tributaire de la qualité des interactions entre les différentes disciplines (mathématiques, biologie des systèmes, physio-pathologie, ...) et des représentants de la société civile.

Références

- ANSES. 2011. Recommandations pour la mise en oeuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM (saisine 2009-SA-0285), ANSES, Maisons-Alfort
- Astle W, De Iorio M, Richardson S, Stephens D, Ebbels T. 2012. A Bayesian Model of NMR Spectra for the Deconvolution and Quantification of Metabolites in Complex Biological Mixtures. *Journal of the American Statistical Association* 107:259-1271
- Batista R, Saibo N, Lourenco T, Oliveira MM. 2008. Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:3640-5
- Betton G, Cockburn A, Harpur E, Hopkins J, Illing P, et al. 1994. A critical review of the optimum duration of chronic rodent testing for the determination of non-tumourigenic toxic potential: a report by the BTS Working Party on Duration of Toxicity Testing. *Hum Exp Toxicol* 13:221-32
- Broadhurst DI, Kell DB. 2006. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 2:171-96
- Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC, O'Sullivan O, Cotter PD, et al. 2012. High-throughput sequence-based analysis of the intestinal microbiota of weanling pigs fed genetically modified MON810 maize expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab (Bt maize) for 31 days. *Appl Environ Microbiol* 78:4217-24

- Calabrese EJ, Blain RB. 2011. The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regul Toxicol Pharmacol* 61:73-81
- Calon M, Barthe Y. 2001. *Agir dans un monde incertain. Essai sur la démocratie technique*. Paris, 358 pages
- Chassy BM. 2010. Food safety risks and consumer health. *N Biotechnol* 27:534-44
- Codex A. 2009. Foods derived from modern biotechnology. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome.
- Davies H. 2009. A role for “omics” technologies in food safety assessment. *Food Control* 21:1601- 11
- Davies HV, Shepherd LV, Stewart D, Frank T, Rohlig RM, Engel KH. 2010. Metabolome variability in crop plant species--when, where, how much and so what? *Regul Toxicol Pharmacol* 58:S54-61
- EC CIR. 2013. No 503/2013 of 3 April 2013 on applications for authorisation of genetically modified food and feed in accordance with Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulations No 641/2004 and (EC) No 1981/2006. *Official Journal of the European Union*, L157 1-48.
- EFSA. 2008. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food Chem. Toxicol.* 46:S2-S70
- EFSA. 2009. Scientific opinion on statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. *EFSA Journal* 1250:1-62
- EFSA. 2011. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants¹, European Food Safety Authority
- Fonseca C, Planchon S, Renaut J, Oliveira MM, Batista R. 2012. Characterization of maize allergens - MON810 vs. its non-transgenic counterpart. *J Proteomics* 75:2027-37
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, et al. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:4803-7
- Garcia-Canas V, Simo C, Leon C, Ibanez E, Cifuentes A. 2011. MS-based analytical methodologies to characterize genetically modified crops. *Mass Spectrom Rev* 30:396-416
- Gong CY, Wang T. 2013. Proteomic evaluation of genetically modified crops: current status and challenges. *Front Plant Sci* 4:41
- Houston NL, Lee DG, Stevenson SE, Ladics GS, Bannon GA, et al. 2011. Quantitation of soybean allergens using tandem mass spectrometry. *Journal of proteome research* 10:763-73
- Jacob D, Deborde C, Moing A. 2013. An efficient spectra processing method for metabolite identification from 1H-NMR metabolomics data. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405:5049-61
- Knight AJ. 2009. Perceptions, knowledge and ethical concerns with GM foods and the GM process. *Public Underst Sci* 18:177-88
- Konig A, Cockburn A, Crevel RW, Debruyne E, Grafstroem R, et al. 2004. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem Toxicol* 42:1047-88
- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HP, Kok EJ. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J* 27:503-28
- Kuiper HA, Kok EJ, Engel KH. 2003. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Curr Opin Biotechnol* 14:238-43
- Malatesta M, Boraldi F, Annovi G, Baldelli B, Battistelli S, et al. 2008. A long-term study on female mice fed on a genetically modified soybean: effects on liver ageing. *Histochem Cell Biol* 130:967-77
- Mendelsohn M, Kough J, Vaituzis Z, Matthews K. 2003. Are Bt crops safe? *Nat Biotechnol* 21:1003-9
- Natarajan SS, Xu C, Cregan P, Caperna TJ, Garrett WM, Luthria D. 2009. Utility of proteomics techniques for assessing protein expression. *Regul Toxicol Pharmacol* 54:S32-6
- Rajan SR, Letourneau DK. 2012. What risk assessments of genetically modified organisms can learn from institutional analyses of public health risks. *J Biomed Biotechnol* 2012:203093
- Ricroch AE, Berge JB, Kuntz M. 2011. Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques. *Plant Physiol* 155:1752-61
- Seralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, et al. 2012. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food Chem Toxicol* 50:4221-31
- Snell C, Bernheim A, Bergé JB, Kuntz M, Pascal G, et al. 2012. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. *Food Chem. Toxicol.* 50:1134-48
- Xu W, Li L, Lu J, Luo Y, Shang Y, Huang K. 2011. Analysis of caecal microbiota in rats fed with genetically modified rice by real-time quantitative PCR. *J Food Sci* 76:M88-93
- Yuan Y, Xu W, He X, Liu H, Cao S, et al. 2013. Effects of genetically modified T2A-1 rice on the GI health of rats after 90-day supplement. *Sci Rep* 3:1962

2. Description des activités

Notre projet s'inscrit dans le cadre d'un **programme de recherche et non d'une étude réglementaire**. Par conséquent, les expérimentations seront menées selon les exigences de standard de qualité principalement selon la norme iso9001 (par exemple toutes les plateformes sont certifiées iso9001). Le consortium organisé pour faire face aux multiples enjeux de ce projet réunit des compétences techniques, scientifiques et en sciences humaines et sociales autour de 19 partenaires en relation avec la création d'un espace d'échange.

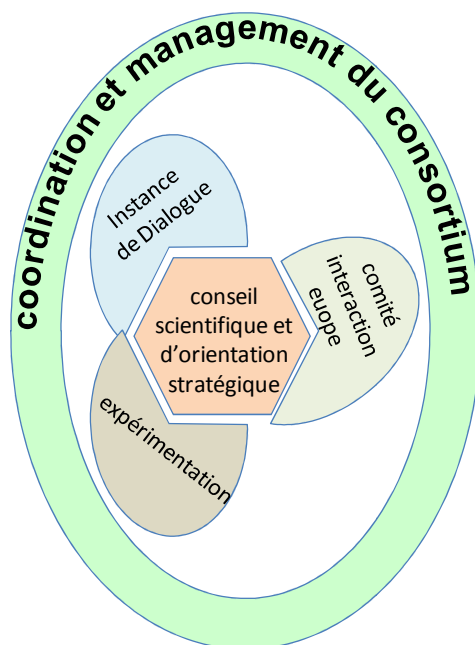
2.1. Organisation

L'organisation générale, placée sous la coordination de B Salles (Figure 4), est la suivante:

- **Management et coordination du projet:** Inra et Anses

- **Conseil scientifique et d'orientation stratégique:** ce conseil réunit le coordinateur du projet, les coordinateurs des 5 lots, le représentant de l'ANSES, les coordinateurs des 3 programmes européens sur les PGM, J Schiemann (GER- GRACE), G Kleter (NL- MARLON), P Steinberg (GER- G-TwYST) et des personnalités extérieures. Ce conseil est chargé du développement des expérimentations et d'orientation stratégique de la recherche.

Figure 4 : Organisation globale



- **Le comité d'interaction "europe"** regroupe les 3 porteurs des projets européens sur les PGM, des personnes extérieures, un partenaire de l'Anses et B Salles.

L'activité scientifique est répartie dans l'un des 4 Lots qui seront en interaction permanente (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

2.2. LOT 1 – Management, coordination et information (INRA Toxalim)

2.2.1. Lot 1- Partie 1: Management et coordination (INRA Toxalim)

Le présent consortium s'intéresse à la caractérisation des dangers liés aux PGMs. Afin de mettre en place un plan de travail efficace, il est nécessaire de construire l'état de l'art le plus exhaustif possible, de rassembler les ressources et compétences scientifiques optimales, d'interagir avec les initiatives européennes ainsi qu'avec la population la plus générale possible, notamment pour appréhender la perception sociale du sujet. Une tâche spécifique est donc nécessaire afin d'assurer le succès de la démarche. Cette tâche vise à fluidifier les canaux de communication et l'organisation des interactions entre les différentes structures, groupes et partenaires. Elle est en relation étroite avec les autres tâches et instance de gouvernance du consortium.

Figure 5 : Organisation des lots

Lot 1 : Management, coordination et information	<ul style="list-style-type: none"> responsable de lot : Bernard SALLES (INRA) partenaires : ANSES (F Fourès) et responsables des autres lots
Lot 2 : Production et caractérisation des maïs OGM	<ul style="list-style-type: none"> responsable de lot : Florence FORGET (INRA) partenaires : INRA, ENS Lyon
Lot 3 : Statistiques et modélisation expérimentales	<ul style="list-style-type: none"> responsable de lot : Rémi SERVIEN (INRA) partenaires : Methodomics, IMT – Université Paul Sabatier
Lot 4 : Effets des formulations sur les tissus, hormones et fonctions	<ul style="list-style-type: none"> responsable de lot : Jean-Pierre CRAVEDI (INRA) partenaires : INSERM, Laberca
Lot 5 : Identification de biomarqueurs par des approches utilisant les technologies haut-débit des « omiques »	<ul style="list-style-type: none"> responsable de lot : Xavier COUMOUL (INSERM, Université Paris Descartes) partenaires : INRA (TRIX, AXIOM), Agilent, Profilomic

Composition et tâches de l'instance

Le management et la coordination du consortium est piloté par son responsable, accompagné des responsables des 4 autres lots et des collègues de l'ANSES. Les tâches spécifiques du management et de la coordination du consortium sont les suivantes :

- Fournir et partager avec tous les partenaires l'état de connaissance le plus exhaustif possible sur les PGMs. Les synthèses scientifiques et les documents de vulgarisation seront coordonnés par cette tâche et fournis sur différents site web public, notamment du MEDDE et de l'Anses.
- Les différentes synthèses seront discutées parmi tous les partenaires afin d'identifier les travaux de recherche à conduire dans le domaine des PGMs. L'objectif est d'enrichir le programme de recherche spécifique décrit dans le présent projet et d'identifier les recherches à long-termes qui permettront de mieux caractériser les dangers liés au PGMs.
- La présente instance est également en charge de la réalisation du diagramme de Gantt (Figure 6). Elle collectera les différentes étapes et les livrables, identifiera les problèmes dans leur suite logique afin de permettre la fluidité du travail, elle soulignera les étapes et livrables clés et négociera le calendrier pour les atteindre. En conséquence, l'instance sera en charge du respect des rendus par les partenaires. L'expérimentation est programmée sur 6 mois mais après accord avec P Steinberg nous pourrions disposer, si l'aval est donné lors du "kick off" meeting du projet G-TwYST (les 1 et 2/09/14, JKI, Berlin), de prélèvements biologiques à 2 ans (sang, urine, organes). Ainsi le programme pourra être étendu jusqu'en 2018 sous réserve d'accord du MEDDE et d'un financement complémentaire.
- Cette tâche définira les règles communes en termes de ressources humaines, d'opérations techniques, d'aspects éthiques et financiers, de qualité et de conditions d'hygiène et de sécurité.
- Elle aura en charge la préparation de lignes directrices pour chaque tâche afin de définir leurs rôles et champs d'action respectifs.

- Elle assurera la disponibilité des équipes en accord le programme validé par le comité scientifique et stratégique, planifiera les agendas entre les différents partenaires, enregistrera et partagera les tâches de tous les partenaires impliqués dans le programme.
- Ce comité aura en charge la préparation de toutes les procédures nécessaires pour l'établissement de prestations en respectant les règles de marché public, pour les travaux sur les animaux par exemple.

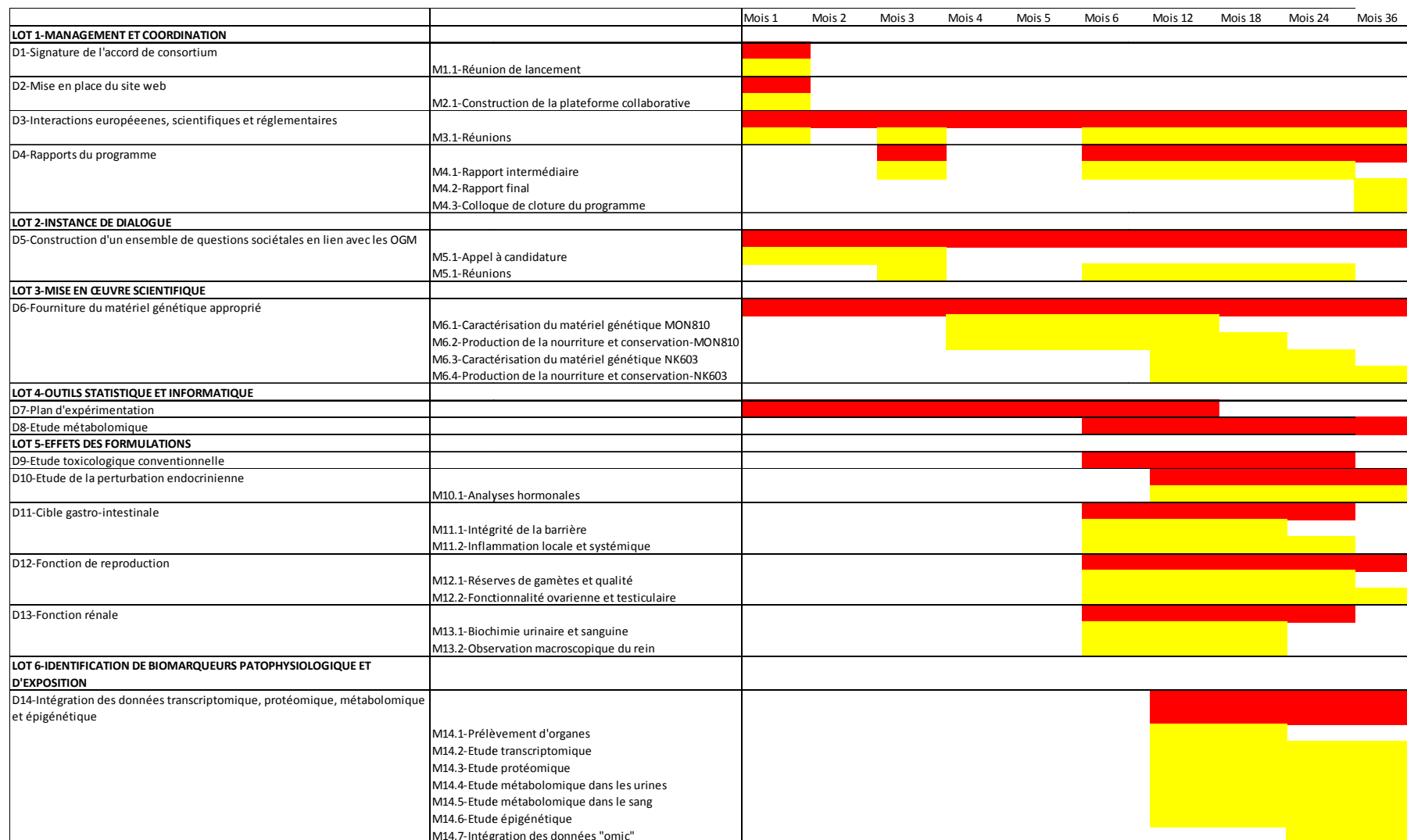
Valorisation

Le management et la coordination du consortium sera en charge des tâches spécifiques en lien avec la valorisation. Le plan de publication sera coordonné et validé par ce comité. Il assurera que toute présentation utilisant les travaux développés dans ce programme fera référence aux financeurs et au programme défini (posters, thèses, protocoles, synthèses, rapports,...). Dans cette tâche, le comité rendra disponible toute présentation ou mise à jour de données pour tous les partenaires. Il identifiera également les brevets potentiels qui pourraient découler du présent programme sur l'amélioration du test de toxicité à 90 jours pour les PGMs. Le comité assurera donc un soutien aux équipes de recherche en particulier dans les relations avec les structures de valorisation des différents établissements.

En outre une charte relative à la politique de publications sera construite collectivement et suivie par chaque partenaire du consortium. Les résultats généraux seront proposés pour évaluation dans le cadre d'un accord entre les programmes GRACE, G-TwYST et GMO90+ avec l'éditeur de la revue Archives of Toxicology.

Enfin, une relation étroite sera mise en place avec les autorités réglementaires européennes représentées dans le forum européen.

Figure 6 : Diagramme de Gantt (fourni au moment du dépôt du projet)



Développement d'une interface intranet et internet

Afin d'atteindre les objectifs du consortium, le comité mettra à disposition une plateforme dématérialisée privée et totalement sécurisée, sur laquelle un espace indépendant sera dédié au consortium. Cet espace intranet aura un accès privé pour les partenaires et une interface intuitive pour le dépôt ou la modification des différents documents. Cette base de données sera ensuite enrichie par tous les documents utiles pour le programme comme les publications, les rapports,... Des fichiers vidéo des différentes réunions de travail, séminaires, entre les partenaires.

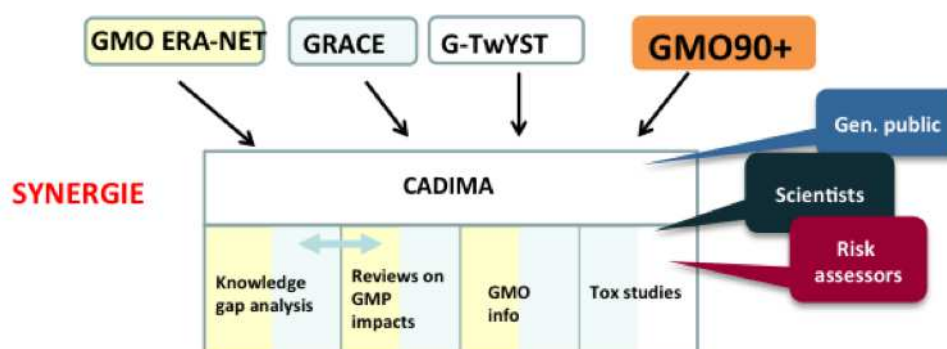
Une adresse mail, créée pour le projet, récoltera les réactions des partenaires sur différents sujets, dont ceux de la société civile et des industriels, afin d'enrichir la réflexion sur les PGMs.

En attendant la mise en place de cet outil nous échangeons les documents via le site extranet de l'ANSES avec autorisation d'accès pour 28 personnes.

Ouverture et transparence

Dans la ligne de notre politique de transparence (voir Lot 1-Partie 2) et de partage des données, nous avons décidé de participer à la base de données gérée par le JKI (un des lots du programme GRACE) et nommée CADIMA (Central Access Database for the Impact Assessment) of Crop Genetic Improvement Technologies (Fig. 7). Cette base permettra à toute personne qui en fera la demande de consulter et télécharger les données brutes obtenues par les 3 programmes européens et le programme GMO90+ financé par le MEDDE. Les données seront disponibles dès que les articles issus du travail expérimental auront été publiés.

Figure 7 : Base de données collective gérée par le JKI



Concernant les fluides biologiques et organes prélevés non soumis à dosages, ceux-ci seront conservés dans un congélateur à -80°C et disponible sur simple demande qui devra être avalisée par la personne responsable du programme RiskOGM du MEDDE. En particulier des organes autres que foie et rein seront conservés pour des programmes de recherche proposés par d'autres laboratoires publics. Cette politique d'ouverture est partagée avec nos collègues des programmes européens. Ainsi, nous souhaitons limiter l'utilisation des animaux en expérimentation en rapport avec notre volonté de prise en compte du principe des 3R en expérimentation animale. Ces 3 projets GRACE, G-TwYST et GMO90+ sont basés sur des expérimentations avec près de 2000 rats sacrifiés et c'est aussi une des raisons pour lesquelles nous avons décidé de conserver à -80°C (en France pour GMO90+ et en Allemagne pour G-TwYST) des prélèvements biologiques (fluides biologiques et organes) non utilisés pour permettre aux laboratoires de recherche d'obtenir en libre accès des échantillons, sur simple demande sur la base d'un projet de recherche.

2.2.2. Lot 1- Partie 2 : Information des parties prenantes (ANSES)

Le projet intitulé PGM/GMO90+ intervient dans un contexte où le débat sociétal sur la question de l'impact environnemental et sanitaire des organismes génétiquement modifiés, et plus spécifiquement des PGM, reste très controversé. Ainsi, il est apparu nécessaire à l'origine du projet de concevoir un dispositif permettant d'associer la société civile à son déroulement. La constitution d'une instance de dialogue a donc été proposée initialement, l'Anses a été chargée de son organisation et de son animation dans le cadre d'un WP spécifique.

L'objectif attendu de cette instance intitulée « ID OGM 90+ », était de :

- faire émerger les questionnements et les attentes dont les différents acteurs de la société civile sont porteurs.
- favoriser les conditions d'une mutuelle compréhension des objectifs et des conditions de réalisation du projet de recherche.
- mobiliser l'ensemble des données ou connaissances existantes de manière à enrichir le contenu et la démarche de recherche.
- identifier les objets et points éventuels de controverse sur lesquels il importera d'être particulièrement vigilant lors de la conduite du protocole de recherche.

Concernant la composition et le fonctionnement envisagé, l'Anses a appliqué la même démarche que celle mise en œuvre au sein des instances de dialogue qu'elle anime.

A la suite d'un appel public à manifestation d'intérêt, tous les représentants d'associations, d'entreprises et d'organisations ayant des activités et/ou des connaissances dans le domaine des plantes génétiquement modifiées et de leur évaluation toxicologique ayant fait acte de candidature ont été retenus.

La première réunion de l'instance de dialogue « ID OGM 90+ » a eu lieu le 28 mai 2014 à l'Anses.

Au cours de cette première réunion, des représentants des organisations associatives ont fait part de leur décision de se retirer, dès le début de la réunion, notamment pour des raisons touchant aux modalités du projet de recherche en lui-même et de la participation des industriels à cette instance.

Cette tentative n'ayant pas pu aboutir, l'Anses a modifié sa contribution au projet en s'associant au lot 1 élargi à la question de l'information des parties prenantes sur l'avancement du projet.

La contribution de l'Anses concerne seulement l'information et la communication aux parties prenantes. Le volet relation avec les médias, est traité par ailleurs dans le projet.

Cette information sera majoritairement axée sur l'organisation de plusieurs points d'information des parties prenantes (3/4 réunions). Afin d'éviter toute redondance à la fois pour les scientifiques du projet venant présenter leurs travaux et pour les parties prenantes intéressées, l'Anses s'appuiera en partie sur les réunions planifiées par le programme RiskOGM. L'Agence pourra organiser des réunions complémentaires ouvertes à l'ensemble des parties prenantes pour couvrir les étapes clés du projet.

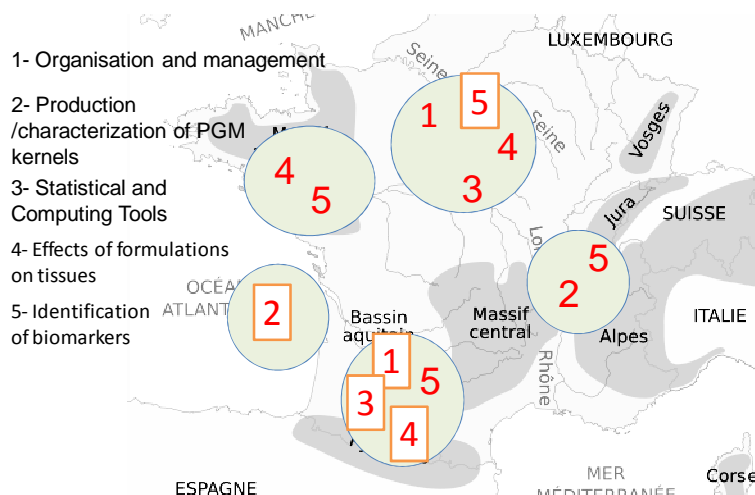
A l'issue de ces réunions, l'Anses rédigera un document de synthèse qui sera rendu public (mis en ligne sur la page internet dédiée au projet GMO90+ et transmis aux parties prenantes). En lien avec les scientifiques du projet, il pourra être décidé de procéder à une mise en consultation publique de certains de ces documents. Dans le cadre de ces consultations, l'ensemble des commentaires reçus sera repris sous forme de tableau, avec les réponses apportées par les scientifiques. Ce tableau et la version amendée du document seront également rendus publics.

Des actions complémentaires pourront également être prévues, en fonction des besoins exprimés.

Répartition géographique des différents laboratoires

La situation géographique des laboratoires et coordonateurs des lots est représentée sur la Figure 8:

Figure 8 : Localisation des lots et de leurs responsables



Ainsi, compte tenu de la sensibilité du sujet, de la difficulté d'instaurer un dialogue, ce projet sera comme prévu mené en totale transparence avec restitution publique des données expérimentales. En outre les rapports des réunions et les présentations seront publiés sur notre site web. Enfin une personne sera recrutée pour la durée du projet et aura en charge la préparation des réunions du projet et avec les partenaires européens, l'actualisation du site web, le suivi du budget toutes ces fonctions en interaction avec la personne responsable du programme RiskOGM et des institutions des partenaires académiques.

3. Les lots relatifs au travail scientifique

3.1. LOT 2 : Production et caractérisation des aliments (INRA MycSA)

3.1.1. Lot 2 Partie 1 : Production (INRA CNRS ENS UMR 879)

La production du matériel végétal adapté à la réalisation des expérimentations d'impact toxicologique sur rats est l'une des clefs de réussite du projet. Ce matériel végétal comprend les variétés de maïs OGM ainsi que leurs homologues non OGM.

Choix et quantités requises de matériel végétal

Deux types de transgènes seront considérés: MON 810 (production de la toxine Bt) et NK603 (résistance au glyphosate). L'introduction d'un transgène étant susceptible dans certaines conditions d'induire des modifications génotypiques et phénotypiques imprévisibles, il est important d'évaluer l'occurrence potentielle de ces événements. Une caractérisation très précise des grains OGM sera réalisée et comparée à celle de grains non OGM issus de variétés les plus proches possibles des variétés transgéniques.

Le choix des variétés s'est fait en fonction de plusieurs critères, le premier étant bien sûr la nature du transgène ainsi que l'absence de l'empilement de plusieurs transgènes dans une seule variété. Le critère d'adaptation à la région de production a aussi été déterminant. Les variétés ont été approuvées par les porteurs des projets européens actuellement en cours de réalisation, qui s'intéressent aux conséquences toxicologiques des événements OGM : projets GRACE et G-TwYST. Il a en effet été décidé d'utiliser le même matériel entre les différents projets. Pour ce qui est de la

production de 2014, procédures de cultures, récoltes, séchage et transport seront partagées avec le projet G-TwYST.

Nous avons ainsi décidé d'utiliser les variétés suivantes:

Pour l'étude de MON 810 :

Variété transgénique : DKC6667YG

Variété isogénique témoin : DKC 6666

Pour l'étude de NK603

Variété transgénique cultivée avec et sans traitement herbicide glyphosate : 882 RR2

Variété isogénique 882 cultivée sans traitement herbicide

L'estimation des quantités requises s'est faite en fonction des différents régimes prévus dans l'étude toxicologique (tableaux 2 et 3) :

3 Régimes pour l'étude MON810 :

- 33% OGM
- 11% OGM + 22% non-OGM
- 33% non-OGM

5 Régimes pour l'étude NK603 :

- 33% OGM avec glyphosate
- 11% OGM avec glyphosate + 22% non-OGM
- 33% non-OGM
- 33% OGM sans glyphosate
- 11% OGM sans glyphosate + 22% non-OGM

Pour l'étude MON 810, un minimum de 144 kg (GMO) et 180 Kg (non-GMO) sera requis (Tableau 1). Pour l'étude NK 603, 144 Kg de grains issus de la variété OGM cultivés avec traitement glyphosate et 144 Kg de la même variété sans traitement herbicide seront nécessaires. La quantité de grains de la variété non OGM est estimée à 252 Kg (Tableau 2).

Pour disposer d'une marge de manœuvre ainsi que d'un échantillonnage représentatif pour les analyses physicochimiques et biochimiques, **les quantités de grains requises ont été fixées à :**

Etude MON 810: 500 kg/500 kg (OGM, non OGM)

Etude NK 603 : 500 kg/500 kg/1000 kg (OGM+glyphosate, OGM, non-OGM)

	33% OGM	11% OGM	22% non-OGM	33% non-OGM	Total GMO	Total non-GMO
poids [g] / rat /j	10,00	3,33	6,67	10,00	13,33	16,67
poids [g] / rat /j pour une expérimentation sur 6mois	1 800	600	1 200	1 800	2 400	3 000
poids [g] pour comparaison (2 x 30 rats)	108 000	36 000	72 000	108 000	144 000	180 000

Tableau 1: Estimation de des quantités de grains pour l'étude MON 810

Culture des maïs OGM

Plusieurs contraintes se posent à cette culture. La première est d'ordre réglementaire puisque si la culture MON 810 et son utilisation est autorisée dans certains pays d'Europe, la situation est différente pour NK 603. La culture de NK603 n'est pas autorisée en Europe, mais son importation et utilisation sont autorisées. La seconde contrainte résulte du fait que les conditions climatiques et environnementales lors du cycle de culture du maïs sont susceptibles d'impacter significativement la qualité et composition des grains. Pour limiter l'impact de ces modifications, même minimales, sur les données issues des études toxicologiques, il est indispensable que les variétés OGM et leur témoin non transgénique soient cultivées sur la même année, sur un même site, avec un itinéraire technique le plus identique possible et un flux de pollen contrôlé. Afin de limiter les flux de pollen, des « zones tampons » seront introduites dans les dispositifs expérimentaux de plein champ.

Les lieux de production ont été définis après discussion avec nos partenaires du projet G-TwYST et négociations avec plusieurs contacts dans des pays où la culture est autorisée.

Il a ainsi été décidé :
Les récoltes seront celles de l'année 2014.

Les cultures de MON 810, variété isogénique et commerciale seront réalisées en Espagne. Deux cultures distinctes (chaque fois les 2 variétés) seront réalisées à des distances suffisantes pour éviter que les deux soient impactés par des accidents climatiques locaux (orage, maladie etc). Seule la récolte de meilleure qualité sera utilisée pour le projet

La culture de NK603 et variété associée sera conduite sur deux sites distants, ce qui permettra d'augmenter les chances de disposer d'une récolte de qualité en limitant les risques liés aux aléas climatiques susceptibles de se produire dans les régions de culture. La localisation correspond à un pays pour lequel la culture est autorisée mais le lieu ne peut être communiqué en accord avec notre partenaire du projet G-TwYST pour éviter toute perturbation sur cette production. Parmi ces deux récoltes, seule la récolte de meilleure qualité sera utilisée pour la suite du projet. Les deux productions (MON 810 et NK 603) seront partagées avec le projet GTwYST.

	33% OGM + Glyphosate	11% OGM + Glyphosate	22% non-OGM	33% non-OGM	11% OGM	22% non-OGM	33% OGM	Total OGM + Glyphosate	Total non-OGM	Total OGM
poids [g] / rat /j	10,00	3,33	6,67	10,00	3,33	6,67	10,00	13,33	23,33	13,33
poids [g] / rat /j pour une expérimentation sur 6mois	1 800	600	1 200	1 800	600	1 200	1 800	2 400	4 200	2 400
poids [g] pour comparaison (2 x 30 rats)	108 000	36 000	72 000	108 000	36 000	72 000	108 000	144 000	252 000	144 000

Tableau 2 : Estimation des quantités de grains pour l'étude NK60

3.1.2. Lot 2 Partie 2 : Caractérisation des récoltes : analyse comparée de la composition des grains OGM (INRA UMR 1332)

L'introduction d'un transgène étant susceptible dans certaines conditions d'induire des modifications génotypiques et phénotypiques imprévisibles, il est important d'évaluer l'occurrence potentielle de ces événements. La comparaison des régimes OGM et non OGM implique aussi une caractérisation très précise de l'ensemble des modifications de composition des grains qui ont pu être induites par le contexte environnemental, même si toutes les précautions ont été prises au moment de la culture pour limiter au maximum cet effet. Il sera aussi indispensable de caractériser très rapidement la présence d'éventuelles contaminants (mycotoxines, pesticides, éléments traces) dans les grains récoltés, afin de valider le plus précocement possible la qualité sanitaire des récoltes. Pour répondre à ces objectifs, une approche analytique très complète, intégrant analyses physiques, biochimiques et microbiologiques sera mise en œuvre afin de caractériser les grains récoltés et de comparer lignées transgéniques et isogéniques. Cette stratégie sera menée en trois étapes :

- (i) Qualité des récoltes et Validation de leur utilisation,
- (ii) Analyses indispensables pour réaliser les formules isoénergétiques et protéiques à la base des différents régimes,
- (iii) Analyses complémentaires permettant de mettre en évidence des différences même mineures entre les productions végétales.

La stratégie analytique définie s'appuie sur le document OCDE ENV/JM/MONO(2002)25 (*consensus document on compositional considerations for new varieties of maize: key food and nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites*) ainsi que sur des échanges que nous avons pu avoir avec nos collègues du projet GRACE et G-TwYST. La campagne analytique sera partagée avec celle du projet G-TwYST. Les protocoles utilisés seront ceux qui ont été validés dans le projet GRACE. Les laboratoires impliqués seront principalement les laboratoires ayant déjà réalisé le même type d'analyse dans le cadre du projet GRACE ainsi qu'un laboratoire pour les analyses mycotoxines.

Qualité des récoltes et validation de leur utilisation

- La première étape est de s'assurer de **l'identité des récoltes** qui nous seront fournies : la récolte OGM contient effectivement le transgène ciblé, les récoltes non OGM n'ont pas été contaminées par la culture OGM. Ces analyses (PCR spécifiques ciblant les événements MON 810 et NK603) seront réalisées par le laboratoire A.Bio.C
- Le deuxième point critique concerne la **teneur en mycotoxines** des récoltes. L'existence de niveaux élevés en mycotoxines et/ou de différences significatives entre les lots, et donc les régimes, serait réducteur. Il est connu que la contamination par les espèces fongiques toxigènes n'est pas homogène à l'échelle d'une exploitation agricole voire une parcelle. Deux cultures présentant une sensibilité identique à l'attaque par ces pathogènes, cultivés sur des parcelles voisines, peuvent conduire à des récoltes contaminées avec différents niveaux en mycotoxines. L'introduction du transgène MON 810 peut aussi conduire à une sensibilité plus faible à la contamination en certaines mycotoxines. Il s'agit en particulier des mycotoxines (et en particulier des fumonisines) produites par des espèces fongiques dites opportunistes, qui profitent des blessures causées par les insectes et en particulier les pyrales pour s'installer et produire leurs toxines. Les analyses mycotoxines seront réalisées par un laboratoire accrédité.

L'ensemble des analyses de cette étape préliminaire est détaillée dans le Tableau 3

Récoltes	Analyses PCR		Analyses mycotoxines				
	MON810	NK603	FB1+FB2	Aflatoxine	DON	Zéa	Ochra
DKC6667YG	x	x	x	x	x	x	x
DKC6666	x	x	x	x	x	x	x
288-RR2*- glyphosate	x	x	x	x	x	x	x
288-RR2*+ glyphosate	x	x	x	x	x	x	x
288*	x	x	x	x	x	x	x

FB1+FB2 : Fumonisines B1 + B2, DON : Déoxynivalénol, Zéa : Zéaralénone, Ochra: Ochratoxine

Tableau 3 : Analyses indispensables avant validation des lots de maïs

Analyses nécessaires à la réalisation des formules isoénergétiques et protéiques à la base des différents régimes

Sont considérées dans ce set d'analyses : la composition en macronutriments (protéines, lipides), la composition en acides aminés et acides gras, la composition en éléments minéraux, la composition en sucres, les teneurs en vitamines et provitamines. L'ensemble de ces analyses est résumé dans le tableau Tableau 4.

Paramètres biochimiques	Humidité
	Amidon
	Protéines total et profil acides aminés
	Fibre (ADF, NDF, CB)
	Lipides totaux et profils acide gras
	Sucres : fructose, glucose, raffinose et sucrose
	Cendres
	Calcium, potassium, Magnésium, Phosphore
	Vit B3, B6, B9, tocophérols et caroténoïdes
	Vitamines B1,B2, PP

Tableau 4 : Analyses requises pour la formulation des granulés

Analyses complémentaires permettant de mettre en évidence des différences même mineures entre les productions végétales

Dans ce troisième volet nous nous attacherons à quantifier les teneurs en composés antinutritionnels (acide phytique, et inhibiteur de trypsine), les métabolites secondaires des grains ainsi que l'ensemble des contaminants potentiels (sauf mycotoxines majeures déjà considérées). Ces analyses ciblées seront complétées par des approches globales, métabolomiques et lipidomiques. Les profils ainsi réalisés permettront de mettre en évidence des différences éventuelles dans les compositions des matrices grains et régimes, portant sur des éléments non ciblés dans la première étape. L'ensemble de ces analyses est reporté dans le tableau suivant ; sont aussi détaillés les laboratoires qui seront en charge de ces analyses.

Cette troisième étape de caractérisation des grains inclura également une analyse génétique SNP sera menée pour mesurer la distance génétique entre les différentes variétés choisies pour cette étude, et notamment la distances entre les lignées isogéniques.

	Métabolites
Contaminants	Résidus de pesticides (comprenant Acetochlor+ mesotrione)
	Eléments traces (Cd, Pb, AS, Cr,Hg)
	Nitrate et nitrite
	Nitrosamines
	Dioxines et biphényles polychlorés (PCBs)
	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)
	Mycotoxines « émergentes » : Beauvéricine, enniatine et moniliformine
Composés antinutritionnels et métabolites secondaires	Acide phytique
	Inhibiteur trypsine
	Acides phénoliques
	DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one)
	Furfural
Profils métabolomiques	RMN: composés polaires
	LC-MS: composés semipolaires
	Lipidomique: composés apolaires
Génétique	SNP analysis

Tableau 5 : Analyses complémentaires sur les maïs grains

3.1.3. Lot 2 Partie 3 : production et caractérisation des granulés (INRA Toxalim)

Pour cette tâche, nous bénéficierons de l'expertise de nos collègues du projet G-TwYST ainsi que de celle de l'entreprise partenaire choisie sur appel d'offre par G-TwYST. Les granulés utilisés dans le projet GMO90+ seront identiques à ceux du projet G-TwYST. Ils correspondent aux 8 régimes définis dans les tableaux Tableau 1 et Tableau 2.

La composition des granulés sera définie afin de garantir un équilibre isocalorique et isoprotéique entre les différents régimes mais aussi de satisfaire aux exigences nutritionnels de la lignée de rats choisie pour l'étude : Wistar Han. La proportion de maïs intégrée dans la composition des granulés (33 %) sera constante quel que soit le régime. La formulation fera appel à d'autres ingrédients végétaux tels que du blé, des remoulages de blé, de la farine et huile de soja. Aucun ingrédient d'origine animale ne sera utilisé.

L'introduction d'éléments végétaux autres que les maïs caractérisés implique d'appliquer l'ensemble des analyses définies précédemment sur les différentes granulés et de compléter par de nouvelles analyses. Les teneurs en lectines et isoflavones seront déterminées (RIKILT). Il est aussi indispensable de s'assurer du maintien de la composition des granulés tout au long des 6 mois d'expérimentations. Le tableau Tableau 6 reprend la totalité des analyses qui accompagneront le projet ainsi que les matrices (grains ou granulés concernées).

	Analyses	Grains	Granulés T0	Granulés T2	Granulés T4	Granulés T6
Caractéristiques biochimiques	Humidité	x	x			
	Amidon	x	x			
	Protéines totales	x	x			
	Profil acides aminés	x	x			
	Fibre (ADF, NDF, CB)	x	x			
	Lipides et profils acides gras	x	x	x	x	x
	Sucres	x	x			
	Cendres	x	x			
	Ca, P	x	x			
	Vit B3, B6, B9, tocopherols and carotenoids	x	x			
	Vitamins B1,B2, PP	x	x			
Mycotoxines	Deoxynivalenol	x	x	x	x	x
	Fumonisines	x	x	x	x	x
	Ochratoxine	x	x	x	x	x
	Aflatoxine	x	x	x	x	x
	Zéaralenone	x	x	x	x	x
	Beauvéricin	x	x	x	x	x
	Eniaticines	x	x	x	x	x
	Moniliformine	x	x	x	x	x

Contaminants et métabolites secondaires	Résidus de pesticides (+ Acetochlor, mesotrione)	x	x			
	Eléments traces (Cd, Pb, AS, Cr,Hg)	x	x			
	Nitrate et nitrite	x	x			
	Nitrosamines	x	x			
	Dioxins et Polychlorinated bi- phenyls (PCBs)	x	x			
	Polyaromatic hydrocarbons (PAHs)	x	x			
	Perturbateurs endocriniens/stockage	non	x	x	x	x
	isoflavones	non	x			
	Analyses	Grains	Granulés T0	Granulés T2	Granulés T4	Granulés T6
	Inhibiteur trypsin	x	x			
	Lectines	non	x			
	Acides phénoliques	x	x			
	DIMBOA	x	x			
	Furfural	x	x			
Profils métabolomiques	RMN: composés polaires	x	x	x	x	x
	LC-MS: composés semipolaires	x	x	x	x	x
	Lipidomique: composés apolaires	x	x	x	x	x

Tableau 6 : Récapitulatif des analyses et matrices concernées

3.2. LOT 3 – Outils statistiques et informatiques (Toxalim, INRA)

3.2.1. Présentation Générale

L'objectif de ce Lot est de garantir la gestion et l'analyse des données selon les standards méthodologiques les plus exigeants et de développer les méthodes statistiques appropriées pour analyser l'influence des régimes d'alimentation. Le développement des « omiques » depuis le début des années 2000 a généré un accroissement exponentiel du nombre de données exploitables. Cependant, si les techniques « omiques » décuplent les possibilités d'investigations biologiques, elles décuplent également les défis de gestion et d'analyse des données. C'est pourquoi nous avons réuni dans ce lot les compétences **d'experts publics et privés**, en amont et en aval des données, afin de définir le plan d'expériences et d'établir un protocole de mesure et d'analyse permettant d'atteindre tous les objectifs de l'étude et d'en garantir la crédibilité (voir Tableau 7). En effet, la qualité des

données peut être altérée par de nombreux paramètres (co-variables non prises en compte, importantes erreurs de mesures...). Si ces derniers ne sont pas prévus et neutralisés en amont, ils peuvent avoir une influence certaine sur les résultats et donc mener à tirer des conclusions hâtives voire erronées (Broadhurst and Kell, Metabolomics, 2006). Par conséquent, afin d'avoir des données d'une qualité irréprochable, il est indispensable de réfléchir puis de définir en amont un plan d'expériences.

Liste des partenaires du lot 3

Nicolas Savy, (IMT- Université Paul Sabatier), maître de conférences à l'Université Paul Sabatier. Spécialiste de planification expérimentale, il est l'auteur de nombreux articles sur le sujet qu'on peut retrouver sur sa page web (<http://www.math.univ-toulouse.fr/~savy/Recherche.html>) ainsi que d'un livre référence (N. Savy, 2006).

Bibliographie :

B. Lepage, D. Dedieu, **N. Savy**, and T. Lang (2012). Estimating controlled direct effects in the presence of intermediate confounding of the mediator–outcome relationship: Comparison of five different methods. *Stat. Methods Med. Res.*

N. Savy (2006). Probabilités et statistiques pour modéliser et décider. Tests, validation, régression, plans d'expérience. Editions Ellipses.

Methodomics

La société METHODOLOGICS (www.METHODOLOGICS.com) a été créée en 2008 par Pierre-Antoine Gourraud, normalien, docteur en biologie et ancien assistant hospitalo-universitaire des hôpitaux de Toulouse (CV en Annexe 3). Elle conjugue l'expertise de 14 collaborateurs dans les domaines biologiques, médicaux et statistiques ce qui lui permettent de répondre à un large éventail de demandes d'analyses de données: analyse de données -omiques, compréhension de mécanismes biologiques, recherche de bio-marqueurs, études cliniques. Son cœur de métier consiste à développer et maintenir des bases de données de qualité intégrant des données démographiques, épidémiologiques et moléculaires pour développer les modèles mathématiques correspondant aux problématiques biologiques de ses clients. Methodomics est spécialisée dans l'externalisation des analyses statistiques pour le domaine biomédical et dispose de l'expertise et de l'expérience pour mener à bien des études statistiques multi-centriques sur des données cliniques et/ou omiques. En 7 ans d'existence, Methodomics a contribué à plus d'une cinquantaine de publications biomédicales. Methodomics travaille pour des organismes publics ou privés en France et à l'étranger.

Bibliographie :

P.A. Gourraud, J.A. Hollenbach, T. Barnette, R.M. Single and S.J. Mack (2012). Standard methods for the management of immunogenetic data. *Meth. Mol. Biol.*, 882, 197-213.

S.J. Mack, **P.A. Gourraud**, R.M. Single, G. Thomson and J.A. Hollenbach (2012). Analytical methods for immunogenetic population data. *Meth. Mol. Biol.*, 882, 215-44.

P.A. Gourraud, C. Le Gall, E. Puzenat, F. Aubin, J.P. Ortonne and C.F. Paul (2012). Why statistics matter: limited inter-rater agreement prevents using the psoriasis area and severity index as a unique determinant of therapeutic decision in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 132(9), 2171-2175.

P.A. Gourraud (2011). When is the absence of evidence, evidence of absence? Use of equivalence-based analyses in genetic epidemiology and a conclusion for the KIF1B rs10492972*C allelic association in multiple sclerosis. *Genet. Epidemiol.*, 35(6), 568-71.

Rémi Servien, chargé de Recherche INRA

Il a obtenu une thèse en Biostatistique en 2010. Depuis 2012, il est chargé de recherche au sein de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Rattaché à l'UMR Toxalim, il est également chercheur associé au sein de l'Institut de Mathématiques de Toulouse (IMT). Au travers de ses différents travaux de recherche, il est devenu un expert dans la mise en place d'outils de modélisation adaptés aux données omiques. Il est également membre du conseil élargi de la Société Française de Statistique (SFdS).

Page personnelle : <http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?rubrique39>

Bibliographie :

R. Servien and D. Concordet (2014). Identification and Quantification of Metabolites in a complex NMR Spectrum. *In preparation*.

R. Servien, L. Mamy, Z. Li, V. Rossard, E. Latrille, F. Bessac, D. Patureau and P. Benoit. (2014) TyPol - a New Methodology for Organic Pollutants Clustering based on their Molecular Characteristics and Environmental Behavior. *Accepted in Chemosphere*.

D. Concordet and **R. Servien** (2014). Individual prediction regions for multivariate longitudinal data with small samples. *Accepted in Biometrics*.

Tableau 7 : Liste des partenaires du lot 3

3.2.2. Lot 3 Partie 1 : Planification expérimentale

Par la longueur inhabituelle de l'étude, l'utilisation des différents régimes (33%, 11% et un groupe témoin) et de deux plantes génétiquement modifiées (PGM), ainsi que par les différents objectifs à remplir, la mise en place de ce plan sera réalisée conjointement par tous les partenaires de ce lot, chapeautés par un spécialiste dans le domaine de la planification expérimentale, **Nicolas Savy**. Cette étape particulièrement importante permet de s'assurer d'avoir un nombre suffisant de données, garantissant la puissance statistique adéquate, ainsi que de leur qualité. Les discussions avec l'ensemble des membres du projet ont permis de s'accorder sur le design expérimental ci-dessous (*Figure 9*).

Une fois les données correctement recueillies, leur analyse sera réalisée en aveugle des régimes d'alimentation. Elle sera confiée à une société experte dans le traitement des données complexes, **Methodomics**, chapeauté par **R. Servien**.

Le design expérimental sera également discuté en amont avec les différents partenaires européens (GRACE, G-TWYST), ceci garantissant l'harmonie des résultats.

3.2.3. Lot 3 Partie 2 : Recueil et gestion de la base de données

Methodomics sera chargée de garantir le stockage, l'intégrité et l'indépendance des données de par sa nature de partenaire extérieur. Les données seront saisies par la CRO dans un masque de saisie spécialement conçu par Methodomics. Elles seront stockées le temps d'être analysées, avant d'être mises à disposition de l'ensemble de la communauté scientifique sur une plateforme commune avec les autres projets européens.

Methodomics assurera le nettoyage, la mise en forme et la mise à disposition du consortium des données recueillies tout au long du projet ainsi que son archivage à l'issue de la mission. Le suivi méthodologique du projet consiste également à impliquer la compétence d'analyse statistique en amont de toutes saisies de données pour garantir leur futur enregistrement dans la base et leur bonne exploitation dans un plan d'analyses établi de concert avec l'ensemble du consortium.

Les différents acteurs de ce workpackage seront également pleinement investis dans la finalisation, la sécurisation, la publication et l'archivage des différents résultats. Nous serons également un interlocuteur expérimenté pour interpréter efficacement les analyses statistiques et en souligner les éventuelles limites.

Figure 9 : design expérimental de l'étude (experimental design)

								régime témoin, sans OGM control diet without GMO		traitement : régimes maïs OGM / non OGM treatment: GMO maize / non GMO maize					
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		sevrage weaning		T0	T90	T135	T180	
								âge des rats rat's age	21j 21d						
1	33%					1	20		acclimation acclimatization		sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
						2a	20					sang*, urine			
						2b	20					sang*, urine, sacrifice			
2	22%	11%				1	20		acclimation acclimatization		sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
						2a	20					sang*, urine			
						2b	20					sang*, urine, sacrifice			
3		33%				1	20		acclimation acclimatization		sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
						2a	20					sang*, urine			
						2b	20					sang*, urine, sacrifice			
4			33%			1	20		acclimation acclimatization		sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
						2a	20					sang*, urine			
						2b	20					sang*, urine, sacrifice			
5			22%	11%		1	20		acclimation acclimatization		sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
						2a	20					sang*, urine			
						2b	20					sang*, urine, sacrifice			
6				33%		1	20		acclimation acclimatization		sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
						2a	20					sang*, urine			
						2b	20					sang*, urine, sacrifice			
7			22%		11%	1	20		acclimation acclimatization		sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
						2a	20					sang*, urine			
						2b	20					sang*, urine, sacrifice			
8					33%	1	20		acclimation acclimatization		sang*, urine	sang*, urine, sacrifice			
						2a	20					sang*, urine			
						2b	20					sang*, urine, sacrifice			
						tous all rats		acclimation acclimatization	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.

3.2.4. Lot 3 Partie 3 et 4 : Analyse des données

Les données analysées comprennent

- des données cliniques avec les paramètres classiquement étudiés en toxicologie (statut sanitaire de l'animal, hématologie, biochimie sanguine...) détaillés en Annexe 5 et conformes à la directive OCDE 408
- des données « omiques » obtenues à partir des échantillons de foie, rein, urine et sang à T0, T90, T135 et T180

La majorité des méthodes statistiques utilisées sont des méthodes usuelles dans le traitement des données « omiques », cependant il est probable, voire inévitable, que le développement de nouvelles méthodes spécialement adaptées aux questions posées soit indispensable. Par exemple, le développement d'une méthode d'aide à la décision pour l'identification structurale de métabolites dans des spectres RMN de mélanges complexes sera étudiée. En effet, chaque métabolite possède une signature caractéristique dans le spectre RMN, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration du métabolite correspondant dans le mélange biologique. Les outils d'analyse des spectres RMN que nous proposons de développer dans le présent projet visent à résoudre deux problèmes : 1/ l'identification des métabolites présents à partir de la forme de leur spectre, 2/ la quantification de l'abondance du métabolite. La méthode envisagée consiste à décomposer un spectre RMN en combinaisons de spectres de métabolites présents dans une bibliothèque de spectres RMN de métabolites purs (e.g. HMDB). Cette méthode donnera lieu à un outil informatique utilisable de manière générique (publication de package R, d'applications C++ etc.) et donc valorisable à l'extérieur du périmètre du consortium, sur le plan de publications ou de l'outil en lui-même.

Toutes les méthodes statistiques utilisées dans l'analyse des données seront également discutées en amont avec les différents partenaires européens (GRACE, G-TWYST), ceci garantissant l'harmonie des résultats.

Methodomics assurera l'intégration et l'analyse principale des données pour le compte du lot 3 sous la direction scientifique de Rémi Servien. Methodomics interviendra indépendamment des expérimentateurs chargés de la conduite de l'essai en lui-même et des analyses de tissus dont elle intégrera les informations pendant toute la durée du projet et contrôlera le respect du protocole expérimental. Les analyses statistiques réalisées seront faites en aveugle de l'appartenance des échantillons au groupe exposé à une alimentation génétiquement modifiée. L'aveugle ne sera levé qu'au rendu du rapport final.

L'analyse par Methodomics inclura une analyse descriptive de la structure de variance/covariance de l'ensemble des données (cliniques et « omiques »). Des méthodes adaptées (supervisées et non supervisées) seront utilisées pour rechercher les différences statistiquement significatives entre les régimes. Une méthode combinant régression Partial Least Squares et Discriminant Analysis (PLS-DA) sera utilisée pour identifier les sources de différences potentielles entre les régimes alimentaires. De surcroît, compte tenu du contexte, il semble opportun de proposer une analyse de bioéquivalence (incluant une analyse de non-infériorité) dont la particularité est d'inverser les traditionnelles hypothèses nulles et alternatives grâce à une procédure dite de TOST (Two One Sided Tests) multivariée qui sera développée spécifiquement pour ces données. Les possibilités de réduire le dimensionnement du problème seront évaluées et les différentes sources de variabilité et de signifiante expérimentale estimées.

Les différentes études d'analyse des résultats seront réalisées avec des outils informatiques reconnus : SAS ou R, ce dernier sera tant que possible privilégié, sa gratuité assurant la reproductibilité des résultats. Leur réalisation, en aveugle des groupes de régime, par un intervenant

privé et extérieur garantira également une plus grande objectivité de l'analyse, une sécurité pour nous et un gage de crédibilité pour les résultats.

3.2.5. Modélisation des données –omiques :

Identification et quantification des métabolites dans un spectre complexe

Dans le projet, le **Dr Rémi Servien** sera chargé de l'analyse des données de métabolomique. La métabolomique est devenue de plus en plus populaire de par les récentes avancées technologiques. Par conséquent, la recherche dans ce domaine est en pleine expansion avec de nombreuses applications. La technique la plus commune utilisée en métabolomique est la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette dernière permet de produire un spectre caractérisant chaque mélange complexe, ce spectre étant la somme des spectres des métabolites présents dans le mélange. Chaque métabolite génère une résonance spectrale qui lui est propre avec une intensité proportionnelle à sa concentration dans le mélange. Le nombre de pics générés par un métabolite, comme leur localisation sur le spectre, est reproductible et uniquement déterminée : chaque métabolite possède donc sa signature sur le spectre.

Un des défis majeurs en analyse RMN est par conséquent l'identification et la quantification des métabolites présents dans un mélange complexe. Différentes techniques ont été récemment introduites, tout d'abord basées sur la connaissance des experts. Ces approches sont cependant biaisées par l'expertise humaine et sont contraignantes et chronophages. Cependant, la construction de méthodes automatiques se heurte à plusieurs difficultés. Tout d'abord, à cause de plusieurs facteurs comme le pH ou l'interaction entre ions, les pics générés par un métabolite peuvent être décalés ou déformés. Ensuite, un mélange complexe peut contenir des centaines ou des milliers de métabolites qui peuvent avoir certains pics en commun. Enfin, comme le nombre de métabolites d'intérêt peut rapidement dépasser le millier, on peut avoir à explorer un espace des possibles très important. La combinaison de ces facteurs rend l'identification et la quantification des métabolites assez délicate en pratique.

De récentes approches ont tenté de surmonter ces difficultés en comparant le spectre du mélange complexe à ceux, déjà obtenus, d'une bibliothèque de métabolites. Par exemple, MetaboHunter consiste à comparer chaque métabolite de la bibliothèque avec la liste des pics du mélange complexe, en se basant exclusivement sur la position des pics dans le spectre. Une fonction de score est ensuite calculée pour chaque métabolite et donne sa probabilité de présence dans le spectre. Cette méthode est très simple et très rapide mais souffre de plusieurs inconvénients. Sa manière de gérer la superposition des pics est par exemple un peu simpliste et pas forcément adaptée. D'autres méthodes, basées sur la modélisation des pics par des courbes de Lorentz puis une estimation par algorithme MCMC, ont également été développées. Elles donnent de bons résultats mais sont très coûteuses en temps de calcul et donc difficilement applicables sur une grosse bibliothèque de métabolites.

Servien et Concordet (2014) ont développé une méthode originale pour l'identification et la quantification automatique des métabolites dans un mélange complexe. Cette méthode traite les différents problèmes évoqués ci-dessus tout en restant très rapide, le but final étant de l'appliquer à une bibliothèque de plusieurs dizaines de milliers de métabolites.

Cependant, cette méthode est encore actuellement perfectible sur différents aspects (algorithmique, précision, robustesse, adaptabilité à différentes machines ou différents milieux). Le but de la thèse qui sera réalisée sur ce sujet sera de rendre cette méthode utilisable en routine par n'importe quel utilisateur de machines RMN. Pour cela, l'intégration d'une étape d'apprentissage à la méthode existante semble indispensable. De plus, un logiciel (probablement un package R) sera édité afin d'être mis à disposition de la communauté scientifique (selon des modalités restants à définir). Enfin,

cette méthode sera appliquée à l'ensemble des spectres RMN générés par ce projet, rendant leur analyse plus rapide et plus sûre.

Intégration des données omiques

Methodomics et Rémi Servien assureront l'analyse des données omiques. Cette analyse de données omiques pour chaque niveau biologique (clinique, transcriptomique, métabolomique) à l'aide de méthodes statistiques devrait permettre de définir et quantifier les relations entre ces données et les différents groupes de traitement. A ce stade, des méta-analyses intégrant des données provenant d'autres origines seront envisagées (avec réduction par z-score multicomposant). Dans la mesure du possible, les signatures identifiées seront validées sur des échantillons indépendants, par cross-validation et si disponible par réplication sur des jeux de données existants.

Les différentes études d'analyse des résultats seront réalisées avec des outils informatiques reconnus : SAS ou R, ce dernier sera tant que possible privilégié, sa gratuité assurant la reproductibilité des résultats. Leur réalisation, en aveugle des groupes de régime, par un intervenant privé et extérieur garantira également une plus grande objectivité de l'analyse, une sécurité pour nous et un gage de crédibilité pour les résultats.

La mission de Methodomics en tant que prestataire indépendant inclut l'assistance des investigateurs dans la publication de leurs résultats. Methodomics s'engage en outre à suivre les recommandations en matière d'analyse de données dans le domaine et à en mettre en œuvre les bonnes pratiques méthodologiques indiquées.

Résumé methodomics : Analyses des données en aveugle

Pour chaque jeu de données, il est prévu

- Une analyse descriptive de l'ensemble des données (cliniques et omiques)
- Variation physiopathologique 10 jours
- La recherche de différences statistiquement significatives entre les différents régimes
- Une combinaison de régressions « Partial Least Squares » et « Discriminant Analysis » (PLS-DA) les sources d'hétérogénéité naturelle et expérimentales, ainsi que les différences potentielles entre les régimes alimentaires.
- Méta-analyses
- Préparation des données du consortium pour une analyse en bio-équivalence, analyse des analogies et limites de la comparaison avec essai clinique de non-infériorité.
- L'analyse de bioéquivalence sensu stricto sera réalisée par Methodomics en dehors du présent contrat et au titre de la R et D de la société. Les résultats seront mis à disposition du consortium et cette méthode innovante et expérimentale pour ce type de données discutée avec l'ensemble des partenaires du projet.

3.3. LOT 4: Effets des formulations sur les tissus, hormones et fonctions (Toxalim, Inra)

Ce lot combine d'une part des approches similaires à celles définies dans la ligne directrice 408 de l'OCDE sur la toxicité orale à doses répétées chez le rongeur (90 jours) et d'autre part des études plus ciblées sur des fonctions ou tissus susceptibles de révéler des effets plus subtiles des régimes OGM. Dans le premier cas, les prélèvements effectués et les analyses opérées permettront de suivre les paramètres biochimiques sanguins et d'observer, à partir des examens histologiques effectués sur les principaux organes, d'éventuels effets phénotypiques des régimes testés. L'ensemble de ces examens sera pratiqué par la structure en charge de l'expérimentation animale qui sélectionnée par appel d'offre. Les principaux paramètres qui feront l'objet d'un suivi seront outre le gain de poids, et la consommation alimentaire, les constantes sanguines et urinaires,

l'histologie du foie, des reins, des gonades (testicule, épидидyme et ovaire), des surrénales, de l'intestin et de l'estomac .

Parmi les approches ciblées figure le statut hormonal des animaux. En effet, l'étude de Séralini et collaborateurs publiée en 2012 puis retirée de la revue Food Chemistry and Toxicology émettait l'hypothèse que le maïs OGM testé, en particulier lorsque traité au glyphosate, pouvait entraîner des perturbations endocriniennes.

Une attention particulière sera également portée à l'intestin en raison du fait qu'il constitue le premier tissu au contact de l'aliment contenant le maïs génétiquement modifié, aux organes et à la fonction de reproduction comme cibles privilégiées d'éventuels effets de type perturbateurs endocriniens, et enfin au rein dont les fonctions pourraient être perturbées.

3.3.1. Lot 4 Partie 1 : Suivi du statut hormonal des animaux

Objectif

L'objectif de ce volet de l'étude consistera à caractériser les éventuelles perturbations induites par les formulations étudiées dans le projet au niveau de la stéroïdogénèse. Les niveaux quantitatifs (concentrations) et les profils qualitatifs (abondances relatives) des principales hormones stéroïdes endogènes seront ainsi déterminés dans un ensemble de 460 prélèvements urinaires collectés chez les différents groupes d'animaux considérés (T0, T90 et T180). Les principaux représentants des hormones estrogènes et androgènes ainsi que leurs principaux métabolites (une trentaine de composés au total) seront ainsi recherchés dans ces prélèvements urinaires, en vue d'une quantification de leurs formes totales, i.e. somme des formes libres et des formes sulfo- et glucurono-conjuguées. La détermination séparée des formes libres et conjuguées, ou la mesure directe de ces dernières, est en effet jugée non compatible à la fois avec les quantités de prélèvements disponibles pour analyse, et avec les ressources nécessaires en termes de moyens humains et financiers. D'autre part, un éventuel impact des formulations étudiées au niveau des systèmes enzymatiques impliqués dans la formation de ces métabolites de phase II pourra être mis en évidence par la mesure des formes totales après application d'un prétraitement de déconjugaison.

Méthodologie

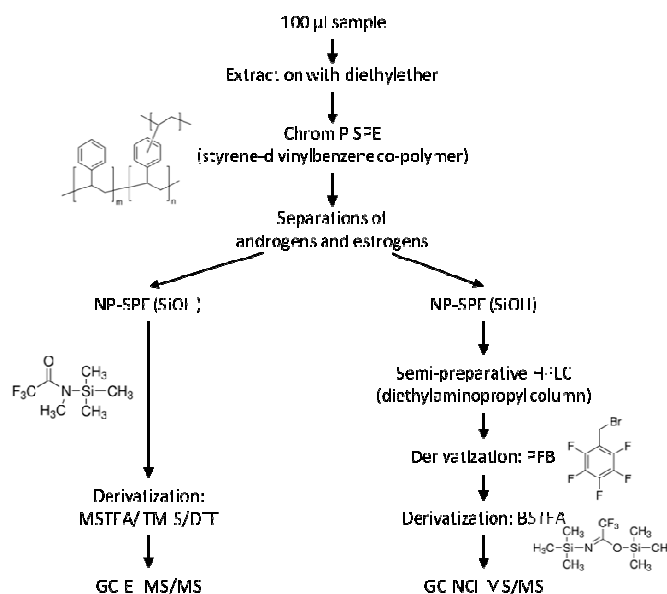
Les hormones stéroïdiennes font partie des composés chimiques historiquement étudiés par le Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA, USC INRA 1329), notamment dans le cadre de ses missions de Laboratoire National de Référence (LNR) de la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture pour le contrôle réglementaire des denrées vis-à-vis d'agents promoteurs de croissance. Des travaux conséquents en termes de développement méthodologique ont ainsi été entrepris dans l'Unité depuis sa création en 1979, aboutissant à plusieurs méthodes validées et accréditées par le COFRAC s'agissant de la mesure de ces molécules dans les fluides / tissus animaux (Anizan et al., 2010, 2011, 2011b; Dervilly-Pinel et al., 2011; Guibert et al., 2013; Kaabia et al., 2013, 2014 ; Le Bizec et al., 1993, 2006; Marchand et al., 2000; Maume et al., 2001, 2003; Pinel et al., 2010; Rambaud et al., 2005; Scarth et al., 2009), les matrices alimentaires (Courant et al., 2007, 2008), et l'eau (Bourgin et al., 2013 ; Soto et al., 2004). Toutefois, au moins trois facteurs participent à maintenir un continuum au sein de l'Unité en termes de recherche méthodologique concernant ces molécules. Le premier facteur est inhérent aux progrès continus sur le plan technologique qui introduisent sur le marché des solutions analytiques toujours plus performantes, qu'il s'agisse de solutions de préparation des échantillons (extraction, isolement et purification des composés cibles à partir de matrices biologiques complexes) ou de mesure (détection, identification non ambiguë, et quantification) par couplage chromatographie-spectrométrie de masse.

Le second facteur est l'apparition de nouveaux besoins en termes de mesure d'hormones stéroïdes dans le domaine de la santé (Courant et al., 2007b, 2010 ; Fowler et al., 2014). En effet, certaines caractéristiques et/ou contraintes inhérentes à ce type d'études, telles que le nombre généralement important de mesures attendues en vue de générer une puissance statistique satisfaisante, le besoin de procédures relativement rapides compatibles avec des approches haut débit, et enfin l'accès dans certains contextes à des volumes de prélèvement extrêmement réduits, impliquent de franchir encore un cap en termes de performances analytiques. Le troisième facteur est enfin la tendance récente et soutenue au développement d'approches plus globales de mesure, i.e. non plus ciblées vers un nombre relativement restreint de paramètres mais au contraire élargies à un profil plus large qui peut être qualifié de « stéroïdome ». L'étude des variations des profils de ces stéroïdes endogènes apparaît notamment d'intérêt majeur dans le cadre d'études s'intéressant à la perturbation endocrinienne, ces hormones représentant alors un ensemble de paramètres pouvant être affectés par certains perturbateurs endocriniens et *in fine* être utilisées comme marqueurs de la perturbation (Anizan et al., 2010, 2011, 2011b; Dervilly-Pinel et al., 2011; Fowler et al., 2014 ; Guibert et al., 2013; Kaabia et al., 2014 ; Pinel et al., 2010).

Plusieurs protocoles analytiques existent donc aujourd'hui au sein du LABERCA pour la mesure des hormones stéroïdes dans les matrices biologiques, utilisés dans différents contextes (contrôle réglementaire des denrées, projets de recherche chez l'animal, études cliniques chez l'Homme). Compte tenu de certaines spécificités du présent projet (niveaux de concentration urinaires attendus relativement faibles, prises d'essai limitées), la stratégie méthodologique employée sera reprise d'une méthode déjà développée et appliquée pour la détermination des principales hormones stéroïdes chez l'enfant prépubère (Courant et al., 2010). Ce protocole associe à la fois une préparation de l'échantillon aussi exigeante au plan technique qu'efficace en termes d'efficacité de purification, et une mesure par couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS). Les étapes de ce protocole (Fig. 11) sont les suivantes :

- Hydrolyse des formes sulfo- et glucurono-conjuguées par l'action d'un mélange de deux préparations enzymatiques (β -glucuronidase *Patella Vulgata* et Arylsulfatase *Helix pomatia*),
- Extraction des composés cibles par le diethylether,
- Séparation des androgènes et des estrogènes par extraction en phase solide (SPE) sur support copolymérique de type styrène-divinylbenzène (Envi ChromP),
- Purification des deux fractions sur support SPE de type silice (SiOH),
- Fractionnement supplémentaire par HPLC semi-préparative pour la fraction estrogène
- Dérivation par le MSTFA/TMIS/DTE pour la fraction androgène, et par le PFB/BSTFA pour la fraction estrogène,
- Mesure par couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS) après ionisation par impact électronique pour la fraction androgène et par ionisation chimique négative pour la fraction estrogène, sur instrument de type triple quadripôle de dernière génération (Agilent 7000 et/ou Brucker Scion).

Figure 10: Représentation synthétique du protocole analytique utilisé pour la mesure des hormones stéroïdes (profilage stéroïdomique) à partir d'échantillons biologiques (d'après Courant et al. 2010)



Deux signaux diagnostiques (transitions SRM) sont suivi pour chaque analyte cible, assurant leur identification non ambiguë. L'introduction d'analogues marqués aux isotopes stables (¹³C ou ²H) est mise en œuvre pour une quantification par dilution isotopique. En l'état, ce protocole permet la recherche multi-classes et multi-composés des molécules suivantes (Figure 11) :

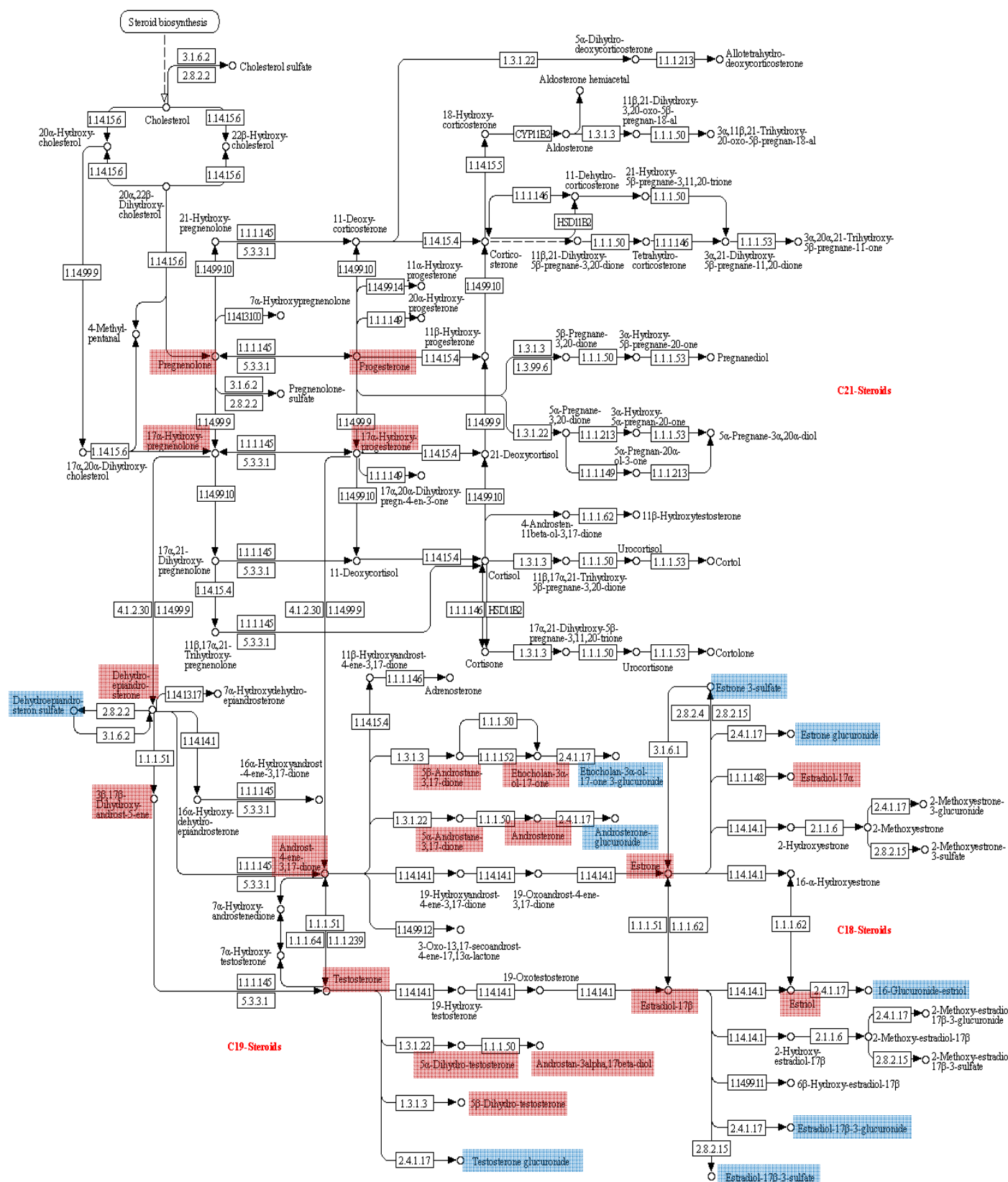
- Androgènes : Pregnenolone ; 17-OH pregnenolone ; progesterone ; 17-OH progesterone ; dehydroepiandrosterone (DHEA) ; 4-androstenedione ; 17β-testosterone ; 17α-testosterone ; 5β-dihydrotestosterone ; 5α-dihydrotestosterone ; 5α-androstane-3,17-dione ; 5β-androstane-3,17-dione ; etiocholanolone ; androsterone ; epiandrosterone ; 5-androstene-3β,17β-diol ; 5-androstene-3β,17α-diol ; 5-androstene-3α,17β-diol ; 5β-androstane-3β,17β-diol ; 5β-androstane-3β,17α-diol ; 5β-androstane-3α,17β-diol ; 5β-androstane-3β,17β-diol ; 5β-androstane-3β,17α-diol ; 5β-androstane-3α,17β-diol ; 5β-androstane-3β,17α-diol ; 5β-androstane-3α,17β-diol ; 5β-androstane-3β,17α-diol ; 5β-androstane-17β-ol-3-one
- Estrogènes : 17β-estradiol ; 17α-estradiol ; estrone ; estriol

Les seuils de détection attendus, pour une prise d'essai de 1 mL d'urine, sont de l'ordre de 5 pg/mL (ppt) pour les estrogènes, et entre 50 et 100 pg/mL (ppt) pour les androgènes. Ces performances actuelles, près de 1000 fois meilleures à celles atteintes au début des années 1990, sont obtenues via la mise en œuvre d'une procédure de traitement des échantillons particulièrement drastique qui représente l'essentiel à la fois de la technicité et du coût en temps personne de cette méthodologie, le traitement de 100 prélèvements nécessitant près de 3 mois personnes et 300 heures d'accès instrumental.

Résultats attendus

A l'issue de ce volet du projet GMO+, un ensemble assez unique de données sera généré permettant d'évaluer l'éventuel impact des formulations considérées sur l'équilibre hormonal stéroïdien des animaux considérés. L'étendue du stéroïdome caractérisé, la prise en compte des formes à la fois libres et sulfo- / glucurono-conjuguées, et la considération à la fois des niveaux quantitatifs (concentrations) et des profils qualitatifs (abondances relatives) des principales hormones stéroïdes endogènes devrait ainsi permettre d'adresser l'hypothèse de travail de façon efficace.

Figure 11 : Positionnement des différentes molécules recherchées dans le schéma général de la stéroïdogénèse (chez l'Homme)



Références

- Anizan S, Bichon E, Monteau F, Cesbron N, Antignac JP and Le Bizec B. A new reliable sample preparation for high throughput focused steroid profiling by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2010;1217:6652-6660.
- Anizan S, Di Nardo D, Bichon E, Monteau F, Cesbron N, Antignac JP, Le Bizec B. Targeted phase II metabolites profiling as new screening strategy to investigate natural steroid abuse in animal breeding. *Analytica Chimica Acta* 2011;700:105-113.
- Anizan S, Bichon E, Di Nardo D, Monteau F, Cesbron N, Antignac JP, Le Bizec B. Screening of androstenedione misuse in cattle by LC-MS/MS profiling of glucuronide and sulfate steroids in urine. *Talanta* 2011b;86:186-194.
- Bourgin M, Gervais G, Bichon E, Antignac JP, Monteau F, Leroy G, Barritaud L, Chachignon M, Ingrand V, Roche P, Le Bizec B. Differential chemical profiling to identify ozonation by-products of estrone-sulfate and first characterization of estrogenicity in generated drinking water. *Water Research* 2013;47:3791-3802.
- Courant F, Antignac J-P, Maume D, Monteau F, Prévost S, André F and Le Bizec B. Determination of naturally occurring oestrogens and androgens in retail samples of milk and eggs. *Food Additives and Contaminants* 2007;24(12):1358-1366.
- Courant F, Antignac J-P, Maume D, Monteau F, Andersson AM, Skakkebaek N, André F, Le Bizec B. Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors. Analytical strategy for estrogens measurements in plasma at ultra-trace level. *Analytica Chimica Acta* 2007b;586:105-114.
- Courant F, Antignac J-P, Laille J, Monteau F, André F and Le Bizec B. Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors. 2. Determination of steroid hormones in milk, egg and meat samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(9):3176-3184.
- Courant F, Antignac J-P, Aksglaede L, Monteau F, Andersson AM, Skakkebaek N, Juul A, André F and Le Bizec B. Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors. Part III: Determination of steroid hormones levels in prepubertal children sera. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010;95:82-92.
- Dervilly-Pinel G, Rambaud L, Sittishack P, Monteau F, Hewitt A, Kennedy G, Le Bizec B. 5 α -estrane-3 β ,17 β -diol and 5 α -estrane-3 α ,17 β -diol: definitive screening biomarkers to sign nandrolone abuse in cattle ? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011;126:65-71.
- Fowler PA, Childs AJ, Courant F, Rhind SM, McIlwain L, Coutts S, Kinnell H, Antignac JP, Le Bizec B, Amezaga MR, Maheshwari A, Bhattacharya S, Monteiro A, Anderson RA, O'Shaughnessy PJ. In utero exposure to cigarette smoke dysregulates human foetal ovarian developmental signaling. *Human reproduction* 2014, In Press.
- Guibert E, Prieur B, Cariou R, Courant F, Antignac JP, Brillard JP, Froment P. Effects of Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on chicken germ cells cultured in vitro. *Environmental Science and Pollution Research* 2013;20:2771-2783.
- Kaabia Z, Dervilly-Pinel G, Hanganu F, Cesbron N, Bichon E, Popot MA, Bonnaire Y, Le Bizec B. Ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry based identification of steroid esters in serum and plasma: An efficient strategy to detect natural hormone abuse in breeding and racing animals. *Journal of Chromatography A* 2013;1284:126-140.
- Kaabia Z, Dervilly-Pinel G, Popt MA, Bailly-Chouriberry L, Plou P, Bonnaire Y, Le Bizec B. Monitoring the endogenous steroid profile disruption in urine and blood upon nandrolone administration: An efficient and innovative strategy to screen for nandrolone abuse in horses. *Drug Testing and Analysis* 2014;6(4):376-88.
- Le Bizec B, Montrade M-P, Monteau F and André F. Detection and identification of anabolic steroids in bovine urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 1993;275:123-133.
- Le Bizec B, Courant F, Gaudin I, Bichon E, Destrez B, Schilt R, Draisci R, Monteau F, André F. Criteria to distinguish between natural situations and illegal use of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle. 1 - Metabolite profiles of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle urine. *Steroids* 2006;71(13-14):1078-1087.
- Marchand P, Le Bizec B, Gadé C, Monteau F and André F. Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2000;867(1-2):219-233.
- Maume D, Deceuninck Y, Pouponneau K, Le Bizec B, André F, Paris A. Assessment of residual concentrations of estradiol and its metabolites in meat. *APMIS* 2001;109(1):32-38.
- Maume D, Le Bizec B, Pouponneau K, Solere V, Paris A, André F. Modification of 17 β -estradiol profile in steer edible tissues after estradiol implant administration. *Analytica Chimica Acta* 2003;483(1-2):289-297.

- Pinel G, Rambaud L, Monteau F and Le Bizec B. Estranediols profiling in calves' urine after 17 β -nandrolone laureate ester administration. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010;121:626-632.
- Rambaud L, Bichon E, Cesbron N, André F and Le Bizec B. Study of 17 β -estradiol-3-benzoate, 17 α -methyltestosterone and medroxyprogesterone acetate fixation in bovine hair. *Analytica Chimica Acta* 2005;532:165-176.
- Scarath J, Akre C, Van Ginkel L, Le Bizec B, De Brabander H, Korth W, Point J, Teale P and Kay J. The presence and metabolism of endogenous androgenic-anabolic steroid hormones in meat producing animals. A review. *Food Additives and Contaminants* 2009;26(5):640.
- Soto AM, Calabro JM, Prechtel NV, Yau AY, Orlando EF, Daxenberger A, Kolok AS, Guillette LJ, Le Bizec B, Lange IG, Sonnenschein C. Androgenic and estrogenic activity in cattle feedlot effluent receiving water bodies of eastern Nebraska, USA. *Environmental Health Perspectives* 2004;112(3):346-352.

3.3.2. Lot 4 Partie 2 : la cible gastrointestinale

Objectif

En dépit du fait que l'intestin constitue la première surface de contact avec les intrants alimentaires, les études destinées à l'évaluation des effets de la consommation d'OGM, se sont très peu intéressées à cette cible. De plus, la majorité des études concernant ces effets se réfèrent à des protéines recombinantes purifiées au détriment de l'évaluation de la matrice OGM entière ingérée. Toutefois, une étude conduite chez la souris exposée à un régime contenant du maïs MON810 pendant 30 et 90 jours montre une altération de l'immuno phénotype des lymphocytes intraépithéliaux (IELs) de l'intestin ainsi qu'une augmentation de cytokines circulantes (IL-6, IL-13, IL-12p70 et MIP-1). De façon intéressante cette étude pointe le fait que les effets adverses observés surviennent de façon marquée chez la souris en période de sevrage et la souris âgée, soulignant le caractère critique d'exposition pendant ces périodes du développement (Finamore et al., 2008). Par ailleurs, la sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 ou l'IL-12 a été décrite comme susceptible de rompre l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et augmenter la perméabilité de cette dernière (Al-Sadi et al., 2009 ; Al-Sadi et al., 2014).

A l'échelle de la cellule épithéliale, la régulation de la perméabilité intestinale est sous la dépendance d'acteurs moléculaires impliqués dans des structures intercellulaires comme les jonctions serrées, (Odenwald et al. et Turner, 2013) ainsi que des processus intracellulaires comme la contraction du cytosquelette (Cunningham et Turner, 2012). Une altération de la barrière épithéliale intestinale de type renforcement de cette dernière, par exemple *via* une surexpression des protéines des jonctions serrées dans les âges précoces de la vie, peut s'avérer délétère car elle empêche une bonne éducation du système immunitaire, notamment par rapport aux antigènes alimentaires (pour revue Turner, 2009). *A contrario*, une barrière intestinale plus perméable permettra l'entrée dans l'organisme de diverses molécules potentiellement délétères, qui pourraient être impliquées dans diverses pathologies digestives et extra-digestives (Odenwald et Turner, 2013). Parmi les acteurs impliqués dans l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale, les mastocytes sont un type cellulaire d'intérêt, car ils peuvent s'activer et/ou dégranuler et sécréter ainsi un nombre important de médiateurs qui ont pour cible l'entérocyte et la régulation de la perméabilité intestinale (Santos et al., 2001 ; Perrier et Cortes, 2011). Cette population cellulaire n'a jamais été étudiée dans le cadre d'une exposition aux régimes contenant des OGM.

Dans ce projet nous nous proposons d'étudier l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale à partir de segments intestinaux provenant des différents groupes de rats prélevés à 3 et 6 mois d'exposition.

Les cibles définies pour l'étude sont donc :

- Les mastocytes : immuno-marquage de la RMCP II (Rat Mast Cell Protease 2)
- La contraction du cytosquelette et protéines de la jonction serrée sur le versant intracellulaire : MLCK (myosin light chain kinase), MLC (myosin light chain) sous sa forme phosphorylée, ZO-1
- Les protéines de la jonction serrée sur le versant extracellulaire : JAM-A, occludine, claudine-2

Méthodologie

Deux types de prélèvements sont nécessaires.

1. des prélèvements de jéjunum et de côlon, rincés au sérum physiologique afin de vider leur contenu. Ils seront congelés immédiatement après le sacrifice de l'animal. Ils permettront d'analyser par western blot JAM-A, occludine et claudine-2
2. d'autres prélèvements, également rincés au sérum physiologique, qui nécessitent un traitement particulier avant traitement et analyse par immunohistochimie des marqueurs RMCP II, MLCK, MLC~P et ZO-1.

En effet, au cours de la congélation, l'eau présente dans les tissus forme des cristaux de glace. Ces cristaux endommagent la structure des tissus, ce qui est gênant pour l'observation au microscope. L'imprégnation par un milieu cryoprotecteur empêche ou retarde la formation de ces cristaux. Ainsi un traitement particulier est nécessaire pour la fixation/préparation de ces tissus, qui doit avoir lieu de suite après le prélèvement. Par conséquent, le prestataire sera en charge de cette préparation expliquée ci-dessous :

- Fixation du tissu : le morceau de tissu est placé dans un pot à prélèvement contenant du paraformaldéhyde 4% tamponné, à +4°C pendant 4-6 h en fonction de la grosseur de l'échantillon.
- Imprégnation : 1h + 1 nuit à +4°C dans une solution de saccharose 30% tamponnée. Il convient de s'assurer que l'échantillon coule au fond du récipient (indique une bonne imprégnation par le saccharose), sinon il faut prolonger le temps d'imprégnation.
- Congélation :
 - Pré-remplir le moule de milieu d'enrobage Neg 50
 - Placer le morceau de tissu dans le moule et l'orienter pour la coupe et compléter le moule avec du milieu d'enrobage.
 - Mettre en contact le moule avec l'isopentane refroidi par l'azote liquide sans le plonger (Figure C).
 - Lorsque le milieu d'enrobage est totalement pris (blanc), on peut plonger le moule dans l'isopentane.
 - Conserver l'échantillon congelé à -80°C.

L'expédition des deux types d'échantillon se fera en carboglace jusqu'au laboratoire.

Références

- Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:2765-78.
- Al-Sadi R, Ye D, Boivin M, Guo S, Hashimi M, Ereifej L, Ma TY. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One*. 2014;9(3):e85345.
- Cunningham KE, Turner JR. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1258:34-42.
- Finamore A, Roselli M, Britti S, Monastra G, Ambra R, Turrini A, Mengheri E. Intestinal and peripheral immune response to MON810 maize ingestion in weaning and old mice. *J Agric Food Chem*. 2008;56(23):11533-9.
- Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(9):1075-83.
- Perrier C, Corthésy B. Gut permeability and food allergies. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(1):20-8.
- Santos J, Yang PC, Söderholm JD, Benjamin M, Perdue MH. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut*. 2001;48(5):630-6.
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.

3.3.3. Lot 4 Partie 3 : reproduction (IRSET-Inserm U1085)

Objectif

Les effets d'une alimentation à base de produits transgéniques sur la reproduction sont encore rares controversés. En effet, si plusieurs études récentes utilisant des aliments à base de riz ou de maïs transgéniques ne montrent pas d'effets nocifs sur la reproduction (Zhou et al., 2012 ; Wang et al. 2013 et 2014), des incertitudes persistent au regard de modifications histopathologiques qui ont pu être observées chez des souris nourries à base de soja transgénique (Vecchio et al., 2004) ou d'effets délétères sur une génération F3 de rat nourris avec du maïs génétiquement modifié pour résister au *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Kiliç & Akay, 2008). Ainsi les effets potentiels à long terme d'une alimentation à base de maïs transgéniques sur la fonction de reproduction doivent être évalués.

L'objectif de cette tâche, est d'étudier les effets potentiels des PGM présents dans l'alimentation des animaux sur les systèmes reproducteurs mâle et femelle.

La reproduction un processus complexe qui implique les organes reproducteurs et les hormones associées. Ce processus complexe est strictement réglementée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Pour le mâle celui-ci qui comprend la testostérone (T), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (D'Cruz et al., 2010). Pour la femelle les hormones hypothalamo-hypophysaires impliquées dans la reproduction sont aussi la LH et la FSH, alors que les hormones ovariennes sont l'oestradiol, la progestérone et l'inhibine.

Le testicule et l'ovaire de mammifère sont des organes qui peuvent être affectés par de nombreux facteurs lorsqu'ils sont exposés à une substance toxique (D'Cruz et al, 2010). Par conséquent il est important de pouvoir estimer si de la nourriture contenant des aliments génétiquement modifiés pourraient avoir des effets délétères sur la fonction de reproduction aussi bien chez le mâle que chez la femelle.

Méthodologie

Chaque groupe d'animaux fera l'objet d'un suivi à 3 et 6 mois sur le poids des organes reproducteur (testicules/ovaires, vésicules séminales, prostate ventrale), la morphologie des testicules/ovaires, l'évaluation des réserves spermatiques chez le mâle et le dosage des hormones sexuelles et gonadotropes.

Aux échéances de 3 et 6 mois, lors du sacrifice de 10 mâles et 10 femelles dans chaque groupe, les différents organes des appareils reproducteurs seront prélevés :

- Un testicule/ovaire sera prélevé par animal pour fixation dans du liquide de Bouin pendant 2 heures, puis après plusieurs lavages dans du PBS ces prélèvements seront déshydratés dans des bains successifs d'alcool de titre croissant, immergés dans du butanol puis inclus en paraffine. Ces différentes étapes seront réalisées par un automate (Citadel®, Thermo Fisher Scientific). Ces échantillons seront ensuite utilisés pour étudier la morphologie testiculaire et ovarienne en comparaison au groupe témoin dont l'alimentation ne contient pas de PGM. Si des différences morphologiques sont observées entre le groupe des animaux témoins et ceux des animaux nourris avec des PGM, des études d'immunohistochimie permettant d'analyser plus en détail certaines populations de cellules par marquage avec des anticorps dirigés contre des marqueurs de ces populations, pourront être menées. Pour chaque animal, l'organe controlatéral sera congelé à -80°C en vue soit de dosage de marqueurs spécifiques, soit pour des études d'expression géniques. analyse sur droit et congélation sur gauche

- Chez les mâles, les épидидymes seront également prélevés par l'équipe IRSET-Inserm U1085, puis congelés rapidement à -80°C pour permettre l'étude des réserves spermatiques. En effet, le nombre et la qualité des spermatozoïdes seront analysés sur les trois différentes parties de l'épididyme : La tête, le corps et la queue. Chaque partie sera homogénéisée à l'aide d'un polytron dans 1 ml de tampon contenant 0.15M NaCl et 0.05% de triton x100. Des numérations de spermatozoïdes seront effectuées en cellules de Malassez puis rapporté au volume total de l'homogénat.

- En parallèle, la prostate ventrale ainsi que les vésicules séminales seront prélevées pour peser afin d'étudier d'éventuels effets de l'alimentation des animaux sur le poids de ces organes de l'appareil reproducteur.

Enfin sur le plasma prélevé sur chaque animal, il sera quantifié des niveaux des hormones sexuelles et gonadotropes : Les concentrations de testostérone et d'oestradiol seront déterminées par dosages radio-immunologiques (RIA ; IM1087, DSL-4800, Beckman Coulter respectivement pour la testostérone et l'oestradiol). Les hormones LH, hCG et inhibine seront quantifiées par dosage ELISA « Enzyme Linked immunosorbent Assay » (KA2332, KA2330 and KA683, Abnova). Un volume total de 700µl de plasma sera fourni pour ces dosages à partir des animaux sacrifiés à 3 et 6 mois d'expérimentation. L'analyse de tous ces paramètres permettront de connaître l'impact potentiel de la nourriture OGM sur la fonction de reproduction.

Références

- D'Cruz SC, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP. Effects of plants and plants products on the testis. 2010 Asian J. Androl 12(4):468-79.
- Kiliç A, Akay MT. A three generation study with genetically modified Bt corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. Food Chem Toxicol. 2008 Mar;46(3):1164-70.
- Vecchio L, Cisterna B, Malatesta M, Martin TE, Biggiogera M. Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean. Eur J Histochem. 2004 Oct-Dec;48(4):448-54.
- Wang EH, Yu Z, Hu J, Xu HB. Effects of 90-day feeding of transgenic Bt rice TT51 on the reproductive system in male rats. Food Chem Toxicol. 2013 ;62 :390-6.
- Wang EH, Yu Z, Hu J, Jia XD, Xu HB. A two-generation reproduction study with transgenic Bt rice TT51 in Wistar rats. Food Chem Toxicol. 2014;65:312-20.
- Zhou XH, Dong Y, Wang Y, Xiao X, Xu Y, Xu B, Li X, Wei XS, Liu QQ. A three generation study with high-lysine transgenic rice in Sprague-Dawley rats. Food Chem Toxicol. 2012 Jun;50(6):1902-10.

3.3.4. Lot 4 Partie 4 : rein et fonction rénale (Inserm U1149)

Objectif

L'objectif de cette partie est de tester la toxicité et l'impact d'une nourriture contenant des OGM sur la fonction rénale des rats. Les paramètres classiques de la fonction rénale seront examinés ainsi que deux marqueurs sensibles NGAL et KIM-1. L'histologie rénale sera également observée afin d'observer d'éventuelles lésions du tissu rénal.

Prélèvements :

Sérum : Le sang sera prélevé avant sacrifice dans des tubes secs. Après centrifugation, le sérum sera congelé à -80°C. 50µL de sérum seront nécessaires pour les analyses.

Urine : Les urines seront prélevées avant le sacrifice, 10µL seront réservés à 4°C pour le comptage des hématies et le reste des urines congelé à -80°C, il faut un volume minimum de 50µL d'urines pour la suite des analyses.

Reins : ils seront prélevés sur chacun des groupes expérimentaux (individus femelles et mâles) qui seront sacrifiés à 3 et 6 mois. Les reins seront prélevés après perfusion cardiaque au PBS afin d'évacuer le sang présent au niveau du rein ainsi que les cellules circulantes. Pour la perfusion, 10ml de PBS seront injectés dans le ventricule gauche du cœur. Une perfusion correcte est montrée par la décoloration du foie et du rein. Un rein sera conservé dans le Bouin pour enrobage final en paraffine, l'autre sera enrobé dans un cryoprotecteur (O.C.T.), plongé progressivement dans l'azote liquide et congelé à -80°C.

Mesure des paramètres de la fonction rénale :

Le taux de protéines, d'albumine et de créatinine seront mesurés dans 50µL d'urines grâce à un analyseur chimique Olympus et aux kits correspondants (plateforme de Biochimie du Centre de Recherche sur l'Inflammation CRI). Pour l'hématurie, 10µL d'urines fraîches seront placés sur lame de

Malassez et les globules rouges seront comptés. Nous examinerons les taux de NGAL et KIM-1, deux marqueurs, l'un pour le déclin de la fonction rénale et l'autre respectivement pour l'insuffisance rénale aigüe. Ces deux marqueurs seront dosés par ELISA dans les urines aux dilutions recommandés par le fournisseur (R&D systems) par l'équipe Monteiro, Inserm U1149. Une hématurie associée ou non avec une protéinurie et des niveaux élevés de NGAL et KIM-1 seront des signes de mauvais fonctionnement rénal (Wu KD et al. 2013 ; Wang EJ et al. 2008). L'albuminurie est signe d'atteinte glomérulaire. Dans le sérum, la créatinine et l'urée seront dosés par la plateforme de Biochimie du CRI.

Histologie :

Les reins paraffinés seront coupés par microtome, déposés sur lames et colorés par acide périodique de Schiff (PAS) et trichrome de Masson. Ces colorations permettent d'observer la présence d'une fibrose, l'état des tubules et des glomérules et de voir de manière générale la présence d'un infiltrat cellulaire immunitaire. Une attention particulière sera accordée à la taille des tubes et des glomérules. Pour confirmer une éventuelle inflammation, les reins congelés et coupés au cryostat seront marqués sur lames avec des anticorps dirigés contre des marqueurs de cellules immunitaires. La fibrose pourra être également confirmée par un marquage anti-fibronectine et anti-collagène.

Références

- Wang EJ, Snyder RD, Fielden MR, Smith RJ, Gu YZ. Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology*. 2008 Apr 18;246(2-3):91-100.
- Wu KD, Hsing LL, Huang YF. Concentration of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with chronic kidney disease. *Clin Lab*. 2013;59(7-8):909-13.

3.4. LOT 5: identification par omiques de biomarqueurs physiopathologiques et d'exposition OMI-OGM90 + (Inserm UMR-S 747 Université Paris Descartes)

3.4.1. Introduction

Le développement des « omiques » à la fin des années 90, a permis l'identification de biomarqueurs pathologiques ou de biomarqueurs d'exposition en toxicologie. Dans ce lot, nous réaliserons une intégration d'un panel de techniques d'omiques (transcriptomique, protéomique, métabolomique, épigénomique) pour identifier de tels biomarqueurs chez des rats exposés aux PGM MON810 et NK603 en se focalisant à la fois sur deux organes cibles potentiels des PGM et en utilisant des échantillons urinaires et sanguins. L'intégration informatique de l'ensemble des données sera réalisée par un partenaire industriel (Agilent) qui dispose d'un logiciel de référence (GeneSpring).

Coordination

Xavier Coumoul est le directeur de l'équipe 1 (Toxicologie, Pharmacologie & signalisation cellulaire, Inserm UMR-S 747, Université Paris Descartes) qui a une expertise reconnue dans le domaine de la signalisation par le récepteur Ah, sur lignées cellulaires et modèles animaux. Plusieurs projets utilisant la transcriptomique ont été menés dans son équipe (lignées hépatiques exposées à des polluants, nerfs optiques). Xavier Coumoul travaillera en interaction avec les coordinateurs des lots 3 et 4 dans le but de corrélérer les manifestations pathologiques caractérisées (dans ces lots) avec les données produites dans le lot 5.

Rappel du protocole expérimental (Tableau 8)

	Dose (% w/w feed)					No of animals	
group	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
Total						240	240

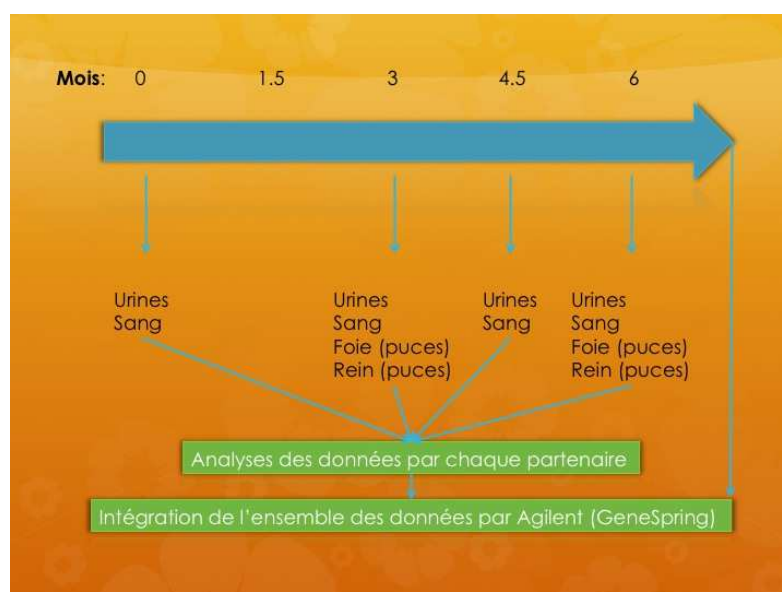
Tableau 8 : Composition des groupes de rats

Les animaux seront étudiés sur une période de 0 à 6 mois. Au cours de cette période, les animaux seront nourris avec 8 lots différents contenant ou non des OGM.

Le nombre d'animaux par lot est égal à 30 males et 30 femelles soit un total de 480 animaux.

Différents prélèvements plus ou moins invasifs seront réalisés à 0, 3, 4.5 et 6 mois (Figure 12). Ceci implique le sacrifice de :

- 160 animaux après 3 mois (soit 1/3 par lot)
- 320 animaux après 6 mois (soit 2/3 par lot)

Figure 12 : Prélèvements pour les analyses omiques

3.4.2. Lot 5 Partie 1 : Transcriptomique

Dans le cadre de cette étude, ces deux tâches permettront l'identification des voies de signalisation activées par l'exposition des rats aux OGM. L'Inserm UMR-S 1124 réalisera les extractions d'ARN totaux de l'ensemble des échantillons. La plateforme TRiX (TRanscriptomic impact of Xenobiotics) réalisera les expériences d'hybridation sur puces 'microarrays' Agilent pour les ARN. Une analyse des profils globaux d'expression des miRNA (par l'utilisation d'une puce 'Rat miRNA Microarray, Release 19.0, 8x15K, G4471A, 719 miRNA') sera aussi effectuée par cette plateforme. Dans ce contexte, l'utilisation d'un scanner Agilent améliorera la reproductibilité et la précision des analyses; l'analyse statistique des données sera réalisée à l'aide de scripts R/Bioconductor (développés par la plateforme).

Description détaillée

Dans le cadre du présent projet, deux organes majeurs seront étudiés par les 2 techniques : le foie et le rein. Ceux-ci constituent des cibles majeures des contaminants alimentaires. Ils jouent par ailleurs un rôle essentiel en nutrition. Des dysfonctionnements de ces organes conduisent à des toxicités bien caractérisées (perturbations métaboliques ou endocriniennes ; insuffisances hépatiques ou rénales). Dans le cadre de ce projet, d'autres tissus seront prélevés et potentiellement analysés extemporanément (organes de la reproduction, du tractus digestif, du système nerveux central). Le choix du foie et du rein repose sur :

- 1) leur rôle essentiel de fonctions de régulations, hormonales, métaboliques, excrétion et élimination
- 2) les variations importantes de leur transcriptome en cas de changement subtil de la composition du régime alimentaire
- 3) leur homogénéité cellulaire comparativement à d'autres organes comme le cerveau ou le testicule.
- 4) la puissance statistique de l'expérience car un plus grand nombre d'échantillons par lot pourra être étudié.

Les animaux doivent être sacrifiés pour analyse. L'ensemble des lots (8) sera étudié à la fois après 3 mois (10 rats par groupe) et 6 mois d'exposition (10 rats par groupe). Pour chaque tissu, un total de 320 échantillons sera donc analysé. La plateforme GeT-TRiX a pu détecter une différence de 2x en terme d'expression des gènes avec une puissance statistique de 99% sur une précédente analyse menée sur le foie de rat. Par anticipation, des changements d'expression supérieurs à 1,5x devraient être aisément détectés avec une puissance statistique de 95%.

Extraction des échantillons à partir des organes

Les foies et les reins seront pesés, disséqués (en prenant systématiquement le même domaine : 100 mg au centre du large lobe hépatique, quart supérieur du rein droit), congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à extraction des ARNs totaux.

L'extraction des ARN totaux sera réalisée avec du TRIzol (Life Technologies, France), leur dosage effectué sur un spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Fisher, France). La concentration de tous les échantillons d'ARN sera dans un premier temps normalisée à 150 ng/μL. Au moins, 3 aliquotes de 10μL et 2 aliquotes de 5μl seront conservés à -80°C. Dans un second temps, 2 autres aliquotes de 20μl normalisés à 200ng/μl seront conservés à -80°C. Un premier aliquote de 5μl sera utilisé pour un contrôle d'intégrité sur un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, France). Le second sera utilisé pour détecter la présence d'ARN potentiellement contaminé à l'aide d'un DropSense 96 (Trinean, France). Les analyses des ARNm et des miRNAs seront réalisées à l'aide des mêmes échantillons initiaux d'ARN totaux concentrés à 150ng/μl. Les aliquotes concentrés à 200ng/μl seront utilisés pour effectuer les validations par RT-qPCR.

Justification de l'utilisation des microarrays Agilent

Dans ce projet, nous utiliserons :

- la dernière version de la puce Agilent Rat G3 Gene Expression microarray (8x60K Format, current design 028279) qui permet d'étudier plus de 30000 ARNs 'Entrez Gene'
- la dernière version de la puce Agilent Rat miRNA microarray (8x15K format, current design 046066, contenu basé sur la base de données miRBase 19.0) qui permet d'étudier l'expression de 719 rat miRNA.

La plateforme de microarrays Agilent a été sélectionnée sur la base de son excellence en terme de prestation et de rapport qualité / prix. Les puces Agilent ont été utilisées dans de nombreuses études ; elles sont mises à jour régulièrement comparativement aux puces Affymetrix et bénéficient ainsi des annotations les plus récentes. Par ailleurs, la plateforme GeT-TRiX a développé ses propres outils d'analyse automatisés, permettant d'étudier jusqu'à 96 échantillons en parallèle ce qui limite considérablement les biais expérimentaux.

Marquage des ARN, hybridation et lavages

A partir des échantillons d'ARN purifiés (et « validés »), nous réaliserons une transcription inverse à l'aide du kit « Agilent low input linear amplification » suivie d'une transcription *in vitro* permettant l'incorporation de CTP marqué au Cy3 et la formation de copyRNA (cRNA). Pour les études sur les miRNA, nous utiliserons le kit de marquage « Agilent RNA 3'-end » permettant la ligation des Cy3-pCp aux extrémités 3' des ARNs.

Toutes les étapes de marquage, purification et hybridation seront réalisés dans des plaques 96-puits sur la plateforme Agilent Bravo sur la base de protocoles validés antérieurement. Pour chaque tissu, nous analyserons les échantillons sur la base de 4 sessions d'hybridation :

- 2 sessions de 80 échantillons (mâles et femelles sacrifiés après 3 mois de régime, n=10 par groupe x 8 groupes)
- 2 sessions de 80 échantillons (mâles et femelles sacrifiés après 6 mois de régime, n=10 par groupe x 8 groupes)

Les étapes d'hybridation et lavages seront réalisées sur la base des recommandations d'Agilent (dans un container sans ozone)

Récupération des données

Les microarrays 'hybridés' seront scannés (images TIFF 20-bits) à l'aide du scanner Agilent high résolution qui inclut un système de calibration automatique (PMT) assurant une haute reproductibilité à cette étape. De plus, l'encodage au format 20-bit permet de limiter les signaux saturants et de détecter les faibles signaux de manière précise.

Analyse des données

Les données seront analysées en utilisant les logiciels R et Bioconductor. Avec plus de 1500 échantillons étudiés chaque année, la plateforme GeT-TRiX maîtrise parfaitement cette étape à la fois pour l'analyse des ARNm et des miARN ; elle a ainsi développé ces propres scripts R permettant :

- un contrôle qualité des données produites à chaque étape
- l'identification des gènes différentiellement exprimés (ARN et miARN)
- la production des représentations « heatmap »
- l'analyse en composantes principales (PCA, Principal Component Analysis)
- la caractérisation de catégories fonctionnelles enrichies et les analyses GSEA (gene set enrichment analyses)

- la recherche d'éléments de réponse enrichis dans les promoteurs de transcrits régulés

Ces outils d'analyse ont déjà été utilisés dans plusieurs études dont celles portant sur des expositions à basse dose de contaminants alimentaires et/ou de perturbateurs endocriniens (Marmugi et al., 2012, Roques et al., 2013). Par ailleurs, nous avons aussi accès au logiciel en ligne 'Ingenuity Pathway Analysis' pour caractériser les voies de signalisation potentiellement activées ou inhibées par certains lots.

L'analyse des données 'microarrays' et leur intégration par Agilent à d'autres données de 'omiques' (Agilent GeneSpring software, voir plus bas) sera également exploitée par les responsables du lot 3.

Références des acteurs

- P.G. Martin**, H. Guillou, F. Lasserre, S. Dejean, A. Lan, J.M. Pascussi, M. Sancristobal, P. Legrand, P. Besse and T. Pineau (2007). Novel aspects of PPARalpha-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. *Hepatology*. 45(3), 767-777
- Roques BB, Leghait J, Lacroix MZ, Lasserre F, Pineau T, Viguié C, **Martin PG**. (2013) The nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism. *Biochem Pharmacol*. 86(7):997-1039.
- Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, Bertrand-Michel J, Pineau T, Guillou H, **Martin PG**, Mselli-Lakhal L. (2012) Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology*. 55(2):395-407.

3.4.3. Lot 5 Partie 2 : Métabolomique des urines (ToxAlim)

Le concept de métabolome fait référence à l'ensemble des métabolites contenus dans un système biologique donné : organisme, type cellulaire ou fluide biologique tel que l'urine ou le plasma. Le terme métabolite inclut les molécules organiques de faibles masses moléculaires (en général <1500Da) telles que les acides organiques, les sucres, les acides gras, les métabolites conjugués, les acides aminés mais aussi certains peptides les vitamines, les stéroïdes, les xénobiotiques et autres molécules exogènes. Les approches métabolomiques sont multidisciplinaires, impliquant des méthodes de chimie analytique (spectrométrie de masse ou résonance magnétique nucléaire principalement), de la bioinformatique et des analyses statistiques.

La plateforme AXIOM (Analysis of Xenobiotics, IdentificatiOn and Metabolism, labélisée IBISA et prochainement certifiée ISO9001) est reconnue comme plateforme stratégique nationale par l'INRA et fait partie intégrante du réseau national de métabolomique MetaboHub. Elle s'appuie sur la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire pour évaluer l'influence des contaminants alimentaires. Dans cette étude, la RMN-1H (Spectromètre Bruker Avance 600 MHz équipé d'une cryoprobe TXI-5 mm) associée à des analyses statistiques multi-variées seront utilisées pour caractériser les métabolomes des échantillons urinaires de rat exposés aux PGM.

Description détaillée

L'objectif de cette tâche, menée par le partenaire Toxalim-Axiom (Toulouse) sera de mettre en évidence d'éventuelles différences métaboliques induites par la consommation de maïs OGM, telles que révélées au niveau urinaire, fluide reflétant le résultat intégré d'un ensemble de processus métaboliques. L'approche métabolomique permet d'obtenir une image fidèle de la "composition" (i.e. teneur en petites molécules) de l'urine dans des conditions physiologiques données. La RMN constitue avec la spectrométrie de masse (qui sera utilisée pour l'étude métabolomique sur les plasmas) la technique la plus couramment utilisée en métabolomique, discipline faisant actuellement l'objet de développements spectaculaires.

La spectroscopie de RMN du proton (¹H NMR) pratiquée sur des biofluides tels que l'urine est rapide, compatible avec des analyses haut-débit, et bien adaptée aux études à large échelle. Cette technique

est non-destructive, ne nécessite pas ou peu de préparation de l'échantillon avant analyse, et fournit une information sur une grande variété de voies métaboliques de façon simultanée.

Dans le cadre du présent projet, une étude longitudinale est envisagée en mesurant, **sur les mêmes animaux**, les empreintes métaboliques urinaires par RMN à 4 temps, répartis le long de l'expérimentation :

- 0 mois
- 3 mois
- 4,5 mois
- 6 mois,

en utilisant **10 animaux mâles et 10 animaux femelles de chacun des huit groupes. Chaque animal sera placé dans une cage à métabolisme afin de recueillir leurs urines sur 24 heures.**

Les spectres RMN du proton seront enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance DRX-600 opérant à la fréquence de 600,13 MHz pour le proton et équipé d'une sonde cryogénique triple résonance $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. Les analyses seront réalisées sur 880 échantillons d'urine (2 sexes x 8 groupes x 5 temps x 11 animaux). Les échantillons d'urine seront préparés en mélangeant 500 μl d'urine et 200 μl de tampon phosphate 0.2 M préparé dans de l'eau deutériée (pH : 7,4), afin de fixer le pH des échantillons pour limiter les variations de déplacement chimique pour un même métabolite. Le mélange sera centrifugé et 600 μl de surnageant seront transférés dans un tube RMN 5 mm. Les spectres RMN des échantillons d'urine seront obtenus à 300 K avec une largeur spectrale de 20 ppm en utilisant une séquence permettant d'éliminer le signal de l'eau (noesyprsat). Les différents spectres RMN enregistrés seront dans un premier temps phasés et calibrés, puis seront ensuite découpés en « buckets » de largeur 0,01 ppm. Ces buckets seront intégrés et normalisés à l'aide des logiciels TOPSPIN (V2.1, Bruker Biospin, Germany) et AMIX (V3.9.11, Bruker Biospin, Germany) disponibles sur la plateforme.

Les variables RMN ainsi obtenues seront traitées par des méthodes statistiques multivariées en utilisant le logiciel SIMCA-P+ 13.0 (Umetrics, Umeå, Sweden). Dans un premier temps, la méthode d'analyse en composantes principales (ACP), non supervisée, sera utilisée pour détecter d'éventuels échantillons aberrants et mettre en évidence d'éventuelles tendances intrinsèques au sein du jeu de données. Les données seront ensuite traitées à l'aide de méthodes supervisées telles que la PLS-DA (Régression des Moindres Carrés Partiels - Analyse discriminante), qui utilisent l'information sur l'appartenance des individus aux différents groupes pour maximiser la séparation entre les groupes d'échantillons. Les données issues du modèle PLS-DA (loading plot, coefficient plot, VIP), combinées au test de Kruskal-Wallis seront utilisées pour identifier les variables conduisant à la séparation des groupes.

Une méthode de filtrage (Orthogonal Signal Filtering) sera éventuellement appliquée en aval de la modélisation PLS-DA pour supprimer la variabilité non liée au facteur biologique d'intérêt (variétés d'OGM dans cette étude). La méthode A-SCA (Anova-Simultaneous Component Analysis) sera utilisée pour analyser les données longitudinales. Dans la première étape de cette méthode, l'Analyse de variance (ANOVA) est utilisée pour séparer la variabilité totale des données en fonction des facteurs du plan expérimental (Temps, Variété et Interaction Temps x Variété). Puis une ACP est effectuée indépendamment sur chaque bloc de données significatif. La significativité des facteurs est testée à l'aide du test des permutations.

Ces données spectrales seront ensuite exploitées pour identifier les métabolites discriminants (candidats biomarqueurs), en s'appuyant si nécessaire sur des expériences complémentaires de RMN bidimensionnelle (^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C), et en se basant sur des requêtes en banques de données (ex : BRMB <http://www.bmrwisc.edu/metabolomics>; HMDB <http://www.hmdb.ca/>; KEGG

<http://www.genome.ad.jp/kegg/ligand.html>), les données de la littérature et l'expertise du partenaire Toxalim-Axiom dans le domaine de l'identification structurale.

Les résultats attendus devraient permettre de révéler des différences, éventuellement subtiles, entre les métabolomes urinaires des animaux soumis aux différents régimes, et d'identifier ainsi les voies métaboliques concernées.

Références des acteurs

Cabaton NJ, **Canlet C**, Wadia PR, Tremblay-Franco M, Gautier R, Molina J, Sonnenschein C, Cravedi JP, Rubin BS, Soto AM, Zalko D. (2013). Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.* 121(5):586-93.

Jamin EL, Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Cravedi JP, Chevrier C, Cordier S, **Debrauwer L** (2013). *Anal Bioanal Chem.* 2013 Jul 28.

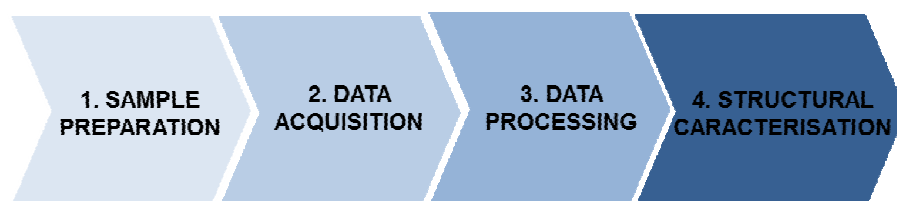
3.4.4. Lot 5 Partie 3 : Métabolomique et lipidomique du plasma (Profilomic)

Caractérisation de biomarqueurs de toxicité dans les échantillons sanguins de rats exposés aux OGM.

Profilomic est une start-up innovante qui propose une expertise en métabolomique et en lipidomique basée sur l'utilisation de la LC-FTMS (Liquid Chromatography-Fourier Transform Mass) à l'aide de spectromètres LTQ-Orbitrap Discovery, Q Exactive, Exactive and Maxis Q-TOF.

Dans l'étude RiskOGM, les échantillons de plasma seront analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution (LC-MS), en mode d'ionisation positive et négative, cette dernière assurant une bonne qualité de la détection des métabolites. Les données spectrales issues de ces analyses seront retraitées par des outils mathématiques spécifiques en vue d'identifier les métabolites d'intérêt biologique. Cette identification sera réalisée à partir des données spectrales de la chimiothèque interne de Profilomic comprenant plus de 1 200 molécules polaires et 2 000 lipides.

Figure 13 : Procédure expérimentale pour l'analyse omique



Description détaillée

Dans le cadre du présent projet, une étude longitudinale est envisagée en mesurant, sur les mêmes animaux, les empreintes métabolomiques du plasma par LC-MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) à 4 temps, répartis le long de l'expérimentation :

- 0 mois
- 3 mois
- 4,5 mois
- 6 mois,

en utilisant **10 animaux mâles** et **10 animaux femelles** de chacun des huit groupes. Les **prélèvements** seront réalisés de manière concomitante à ceux du WP4. Un volume de 100 µL de plasma (200 µL de sang) est nécessaire pour l'expérimentation.

Préparation des échantillons

100 µL de plasma seront exploités pour chaque échantillon. Ceux-ci subiront

- une extraction méthanolique afin d'éliminer les protéines, incompatibles avec les systèmes analytiques utilisés ultérieurement pour les analyses métabolomiques

Métabolomique

Les analyses seront réalisées sur un système LC-MS combinant un appareil Transcend de chromatographie liquide à ultra haute pression et un spectromètre de masse à ultra haute résolution Q-Exactive (technologie Orbitrap technology) équipée d'une source electrospray HESI-II (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Ces analyses seront réalisées en mode d'ionisation positive et négative, afin de protoner et de déprotoner les métabolites étudiés. Les injections seront réalisées de façon aléatoire. Pour chaque échantillon analysé, un fichier brut sera généré. Afin de d'assurer de la qualité des données lors de la phase de retraitement de données, des échantillons de type contrôle-qualité dilués ou non seront injectés en même temps que les échantillons biologiques.

Analyse des données

Les données générées par les approches métabolomiques étant complexes, des retraitements informatiques sont nécessaires. Ainsi, chaque fichier sera retraité à l'aide d'outils informatiques développés par Profilomic à partir de logiciels libres de traitement de données et d'analyses statistiques en langage R. Les pics chromatographiques seront détectés dans chaque échantillon, alignés et un numéro de variable leur sera attribué. Les aires correspondant à chacun de ces pics seront également compilées dans la matrice de résultats. Des critères de validation seront utilisés pour définir les paramètres de cette matrice et ainsi augmenter la fiabilité des variables retenues.

Des analyses statistiques de type multivariée seront ensuite réalisées afin de visualiser dans un espace à deux dimensions les données et de mettre en évidence les molécules discriminantes. Des expériences de fragmentation (MS/MS) seront réalisées si nécessaires pour confirmer l'identité des biomarqueurs potentiels identifiés.

Lipidomique

Les lipides participent au stockage d'énergie, à la signalisation cellulaire ou encore à la constitution des membranes cellulaires. Leur implication dans un grand nombre de pathologies comme le diabète ou les maladies héréditaires neurologiques et métaboliques a déjà été établie. Ils sont également de bons candidats pour la recherche de biomarqueurs de toxicité. Pour obtenir leur profil et comparer leur abondance dans des fluides biologiques, une méthode analytique non ciblée basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry, LC-HRMS) a été développée.

En raison de la grande hétérogénéité des espèces lipidiques présentes dans les fluides biologiques, une base de données spectrales a tout d'abord été créée. Elle contient aujourd'hui plus de 2 000 lipides uniques répartis sur 5 familles et 24 classes : les glycérophospholipides (phosphatidylcholines PC, lysophosphatidylcholines LPC, phosphatidic acides PA, lysophosphatidic acids LPA, phosphatidyléthanolamines PE, lysophosphatidyléthanolamines LPE, phosphatidylsérines PS, lysophosphatidylsérines LPS, phosphatidylinositols PI, lysophosphatidylinositols LPI, phosphoglycérols PG et lysophosphoglycérols LPG), les glycérolipides (monoacylglycérols MAG, diacylglycérols DAG et triacylglycérols TAG), les sphingolipides (céramides Cer, sphingomyélines SM, gangliosides SGL, sulfatides Su, galactosylcéramides GalCer, lactosylcéramides LacCer), les acides gras libres et les stérols et leur dérivés (esters de cholesteryl).

Les lipides sont extraits en utilisant une version modifiée de la méthode décrite par Bligh and Dyer qui assure un recouvrement des 5 familles principales de 93 % en moyenne pour le plasma. Des outils de traitement de donnée adaptés à l'important volume d'information générée par les approches LC-

HRMS ont été développés afin d'identifier les lipides sans ambiguïté. Ils comprennent la détection et l'alignement automatique des pics et une annotation des matrices de données générées basée sur la masse exacte, le temps de rétention, la présence de l'isotope ¹³C et l'abondance isotopique relative (Relative Isotopic Abundance RIA).

Références des acteurs

A. Roux, D. Lison, C. Junot and J.-F. Heilier (Profilomic Team) (2011)., Clin. Biochem., 44 (1), 119-35.
Y. Xu, J.-F. Heilier, G. Madalinski, E. Genin, E. Ezan, J.-C. Tabet and C. Junot (Profilomic Team) (2010). Evaluation of accurate mass and relative isotopic abundance measurements in the LTQ-orbitrap mass spectrometer for further metabolomics database building, Anal. Chem., 82 (13), 5490-501.

3.4.5. Lot 5 Partie 4 : Intégration de l'ensemble des données de « omiques » (Agilent)

Le logiciel Genespring 12.6 développé par Agilent pourra être mis à disposition de l'ensemble du consortium (associé à la formation du personnel adéquate). Il permettra par le biais d'une analyse statistique poussée de réaliser un profilage rapide et global de l'ensemble des voies de signalisation activées ou inhibées par les OGM chez le rat. Genespring 12.6 offre un environnement de travail logiciel qui permet l'intégration des données de transcriptomique, métabolomique et épigénétique et s'intègre parfaitement au projet présenté par le consortium. Une présentation détaillée du logiciel est fournie en annexe Annexe 4.

Description détaillée

Dans cette partie, Agilent fournira un rapport d'analyse préliminaire suite à l'intégration des données produites par les 'tâches' transcriptomique, épigénétique et métabolomiques (urines, plasmas) pour identifier des biomarqueurs précoces d'exposition et de toxicité. L'utilisation d'une nouvelle version du logiciel permet l'importation de toutes les données qu'elles soient produites par LC/MS ou RMN.

Données utilisées pour l'intégration

GeneSpring utilise une variété de fichiers d'importation pour réaliser l'intégration voulue :

- **Transcriptomique** : l'utilisation par la plateforme GeT-TRiX (Pascal Martin/Yannick Lippi, ToxAlim) des outils Agilent (microarrays, scanner...) confère une facilité d'utilisation et de coordination évidente pour l'intégration.
- **Métabolomique des urines** : le logiciel CRAFT produit par Agilent il y a quelques mois, permet la récupération des données générées par RMN (associée à un enrichissement du signal ce qui augmente la probabilité d'identifier des perturbations de certaines voies)
- **Métabolomique des plasmas** : les données produites par LC/MS sur les échantillons de plasmas de rat seront elle aussi récupérées selon un processus analogue à celui des urines.

Utilisation de GeneSpring et analyse fonctionnelle

Les réseaux produits dans GeneSpring 12.6 sont dynamiques et interactifs, permettant de récupérer toutes les données des analyses intégrées, de travailler sur les nœuds d'interactions et d'étendre l'analyse à d'autres réseaux à partir de nœuds d'intérêt sélectionnés. Des algorithmes de type NLP (Natural language processing-based) peuvent être appliqués pour extraire ou ajouter des interactions à une base de données d'interaction existante. GeneSpring 12.6 facilite le processus d'extraction des interactions les plus pertinentes en utilisant les MeSH (Medline). Il permet ainsi de réaliser des analyses à façon (customize network analysis). De plus, GeneSpring 12.6 permet à ces utilisateurs d'importer et de visualiser les voies de signalisation caractérisées aux formats BioPAX et WikiPathways (GPML) et de rapidement déterminer s'il y a un enrichissement de gènes d'intérêt. GeneSpring 12.6 intègre aussi les analyses fournies par les logiciels Ingenuity Pathway Analysis (IPA),

Metacore et CytoScape, pour des analyses complémentaires. De fait, GeneSpring permet l'exportation des données analysées dans des environnements gratuits comme CytoScape (Hartung et al. 2012).

Référence

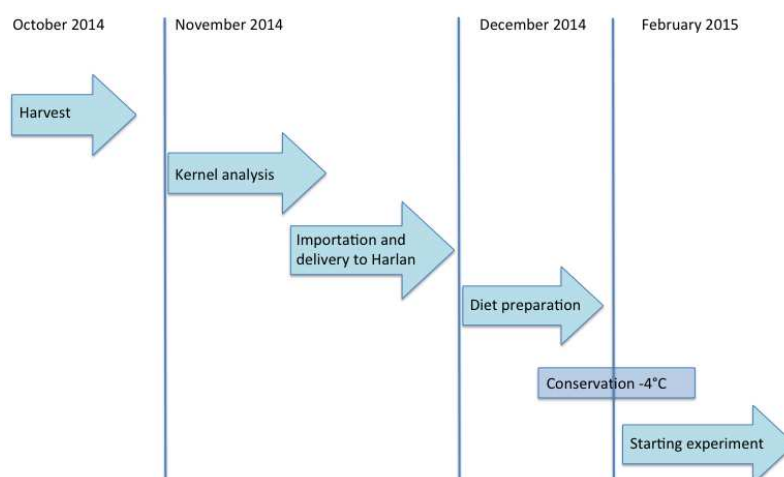
Hartung T, van Vliet E, Jaworska J, Bonilla L, Skinner N, Thomas R., Systems toxicology: Food for Thought, ALTEX. 2012;29(2):119-28

4. Récapitulatif du plan expérimental et proposition d'extension

4.1. Production de maïs

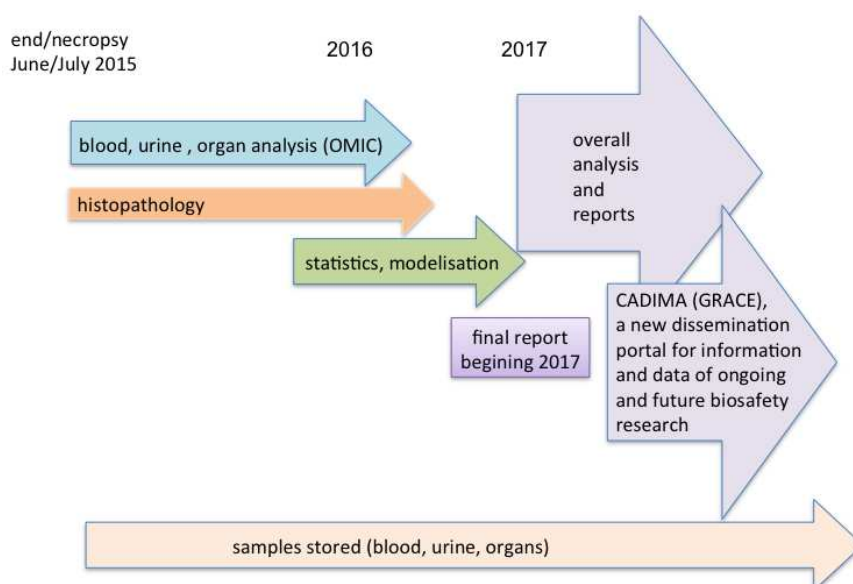
La production est en cours avec une récolte prévue pour octobre. Les étapes : analyses, choix de la récolte (deux lieux de production pour chaque variétés OGM et isogénique non GM), transport, production de granulés et répartition entre G-TwYST et GMO90+, correspondent à 3-4 mois. Les granulés devraient être disponibles pour janvier-février 2015 (Figure 14).

Figure 14 : Production-récolte-préparation des granulés



4.2. Expérimentation animale et analyse des données

Les différentes phases de l'expérimentation animale avec analyse et exploitation des données sont représentées sur le schéma suivant :

Figure 15 : Phases de l'expérimentation animale

Puisque nous avons opté pour une expérimentation animale dans un "contract research organisation" (CRO), nous finalisons le document d'avis d'appel à la concurrence avec ouverture à l'Europe en raison du montant financier. Une estimation a déjà été réalisée auprès d'un CRO pour un montant de 530 k€. L'appel à concurrence tiendra compte tout particulièrement des impératifs expérimentaux (prélèvements, biochimie, histologie, classement des échantillons par code-barre...), possibilité de visite par un membre du consortium dans le cadre d'un processus d'assurance qualité, historique de la société sur des expérimentations à 6 mois et plus chez le rat (voir Annexe 5). Trois CRO situés en France sont susceptibles de répondre à cet appel à concurrence.

L'étude sur 6 mois fait apparaître les demandes et caractéristiques générales suivantes :

2 animaux/cage; **L'unité expérimentale = la cage**

1- Animal welfare

- 1-1 Test facilities, human resources, time scheduling
- 1-2 Species and strain
- 1-3 Number of animals (30 per condition)
- 1-4 Approximate weight and age : 100-120g and will be 5 weeks old
- 1-5 Identification ideally by microchip implant tagging
- 1-6 Animal housing 2 rats per cage. Use separate rooms for male and female

2- Experimental design

- 2-1 Animal receipt and acclimation
- 2-2 Quality assurance
- 2-3 Randomization
- 2-4 Group allocation and dosing

- 2-5 Diets are coded in a "double blind" fashion
- 2-6 Route of administration

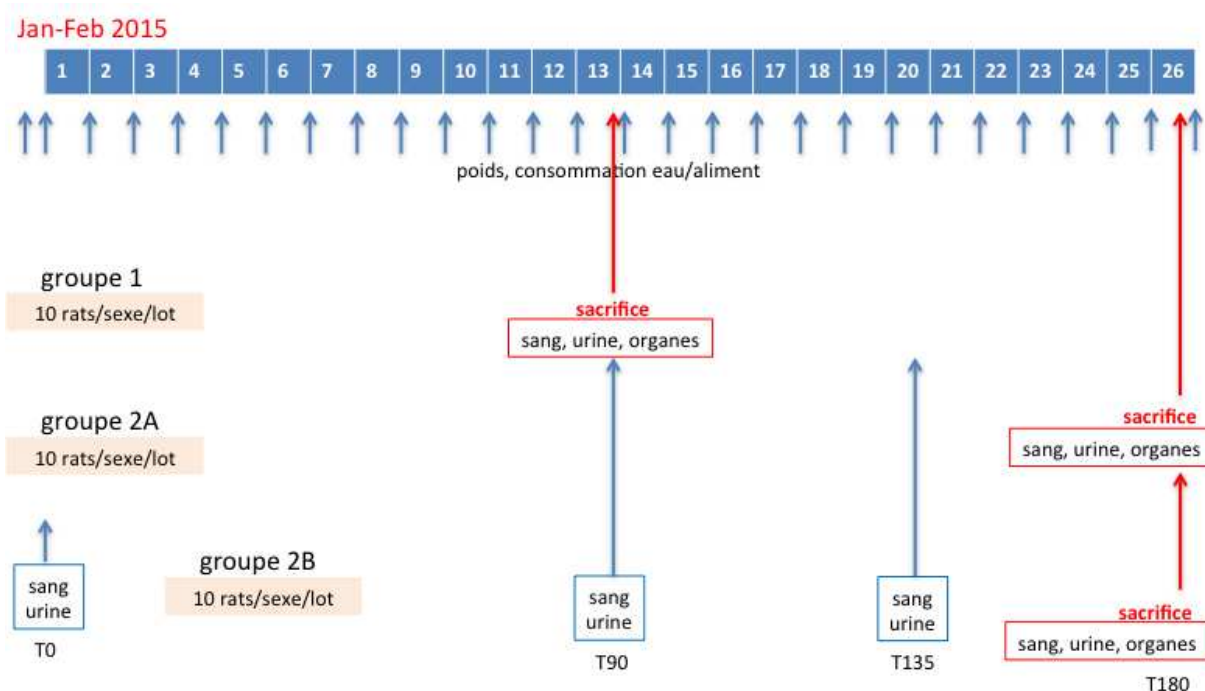
3- Periodical health status observations

- 3-1 Morbidity, mortality (twice daily)
- 3-2 Clinical signs (once a day)
- 3-3 Detailed physical examination (~ end)
- 3-4 Functional assessment (~ end)
- 3-5 Body weight (weekly)
- 3-6 Food/water consumption (weekly)

4- Procedures for sample collection

Blood samples will be divided for haematology, clinical chemistry and omics. Urine samples will be collected for omics. Tissues and organs will be removed and evaluated by histology and omics.

Figure 16 : Mesures et prélèvements dans l'étude sub-chronique chez le rat



4.3. Proposition d'extension de l'expérimentation

Notre objectif consiste à identifier des biomarqueurs précoces d'effets en utilisant les ressources des omiques et une analyse histo-pathologique des 8 groupes de rats (240 mâles et 240 femelles). Cependant l'expérimentation animale du programme G-TwYST sera lancée à des dates proches de celles de GMO90+ avec la même nourriture et la même souche de rats sur une période de 2 ans dans le cadre d'une analyse de cancérogénèse. Ainsi 50 rats mâles et 50 rats femelles seront nourris selon le protocole suivant sous réserve de validation lors du "kick off" meeting de G-TwYST (Figure 17):

Figure 17 : Protocoles de G-TwYST

Group	% of daily dietary intake (w/w)			No. of animals			
	Isogenic non-GM (NK603)	NK603	NK603 + Roundup	Chronic toxicity		Carcinogenicity	
				Males	Females	Males	Females
1	33	0	0	20	20	50	50
2	22	11	0	20	20	50	50
3	0	33	0	20	20	50	50
4	22	0	11	20	20	50	50
5	0	0	33	20	20	50	50
Total				100	100	250	250

Group	% of daily dietary intake (w/w)		No. of animals	
	Isogenic non-GM (MON810)	MON810	Males	Females
1	33	0	50	50
2	0	33	50	50
Total			100	100

P. Steinberg (coordinateur) a donné un accord de principe sous réserve de validation par le consortium lors du "kick off" meeting pour nous fournir des échantillons de plasma, urine et foie pour les groupes 1, 3 et 5 de l'expérimentation NK603 et 1 et 2 de l'expérimentation MON810.

Même si les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes entre G-TwYST et GMO^{90plus}, des dispositions ont été prises afin de minimiser ces différences. L'analyse des échantillons du projet G-TwYST permettra de valider les biomarqueurs identifiés et les modèles mathématiques construits dans GMO^{90plus}.

L'alimentation des rats est prévue de janvier-février 2015 à 2017. Les échantillons seront donc disponibles en 2017 et le rendu des analyses et interprétation sont prévus pour fin 2017, sachant que l'histo-pathologie ne sera pas complète avant 2018.

Une comparaison « exposés » versus « non exposés » à 24 mois sera menée en transcriptomique et métabolomique sur urines entre rats exposés et non exposés. Il a été choisi d'analyser 16 animaux par lot. Les lots sont ceux des groupes 1, 3 et 5 pour NK603 et 1, 2 pour MON810 soit au total 5 lots. Le schéma est le suivant:

transcriptomique sur extraits de foie, T24 mois: 16 animaux * 2 sexes * 5 lots = 160

métabolomique sur urine T24 mois : 16 animaux * 2 sexes * 5 lots = 160

Annexe 1

Projets européens

**→ GRACE : GMO Risk Assessment and Communication of Evidence**

coordinateur = Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants (Allemagne)

- Financement EU (FP7)
- Projet de 3 ans, initié en juillet 2012
- Obj = développer une base de données biblio, mener des études de toxicité *in vivo* chez le rat en vue de définir la pertinence des études à long terme dans le cadre des évaluations réglementaires européennes des PGM et développer des outils alternatifs *in vitro*
- Études 90 jours initiées en avril 2013
- Étude 1 an et étude de métabolomique initiées en janvier et février 2014

→ G-TwYST : GMP Two Year Safety Testing

coordinateur = TiHo, Université de médecine vétérinaire de Hanovre (Allemagne)

- Financement EU (appel 2013) : Two-year carcinogenicity rat feeding study with maize NK603
- Projet de 4 ans, lancé en avril 2014
- Obj = réaliser une étude de toxicité de 2 ans chez le rat avec du maïs NK603 (+MON810) selon les recommandations de l'EFSA et en respectant strictement les standards internationaux (OCDE) pour déterminer l'intérêt des études long terme dans le cadre des évaluations réglementaires européennes des PGM ;
 - = définir les critères pour évaluer la qualité scientifique des études à long terme
 - = définir quand les études long terme sont scientifiquement justifiées

→ **MARLON : Monitoring of animals for feed-related risks in the long term**



- Financement EU (FP7)

- Projet de 3 ans, initié en août 2012

- Obj = développer des outils épidémiologiques pour mettre en évidence des liens entre la consommation d' aliments OGM et des effets chez les animaux d' élevage, créer une base de données des informations recueillies, estimer les expositions des animaux aux PGM, définir des indicateurs de la santé des animaux, identifier les caractéristiques de la chaîne de production

Annexe 2

Coordinateurs du projet et des lots, compétences

Coordinateur du projet: Bernard SALLES

TOXALIM UMR 1331 INRA en partenariat avec l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, L'Ecole d'Ingénieurs Agronomes de Purpan et l'Université Toulouse 3.

Brève description de l'Unité:

Les compétences de l'unité TOXALIM couvrent des domaines scientifiques larges, allant de la physiopathologie digestive aux perturbations d'expression génique impliquées dans le développement de maladies métaboliques et de cancers. Elles s'appuient sur un savoir-faire de ses équipes, reconnu internationalement, en pharmacologie, chimie analytique, métabolomique, transcriptomique...

Ainsi, TOXALIM contribue à l'élaboration de connaissances sur les effets à long terme en santé humaine et animale de toxiques, tels que intrants agricoles, pesticides, mycotoxines, migrants d'emballage et autres contaminants alimentaires. Les projets relèvent plus particulièrement des expositions chroniques de contaminants à faible dose, éventuellement sous forme de mélanges et lors de phases critiques du développement des organismes (néonatal ou périnatal). TOXALIM est fortement impliquée dans l'enseignement supérieur agro-vétérinaire et universitaire en toxicologie, au niveau master et doctorat, ainsi que dans le transfert de technologies et le partenariat avec les industriels de l'alimentation et du médicament vétérinaire. Au niveau régional, TOXALIM est au centre des activités du consortium PA3S (Pôle Aliment: Sécurité Sanitaire et Santé) et du GIS Toulouse Agri-Campus, et collabore étroitement avec les deux Pôles de Compétitivité, présents dans son domaine de compétence: Agri Sud Ouest Innovation et Cancer BioSanté. Les équipes de TOXALIM sont impliquées dans de nombreux projets de recherche collaborative, tant au niveau national (ANR, PNRPE, ANSES...) qu'européen (FP6, FP7).

Chef de projet et coordinateur du Lot 1:

Bernard Salles, Pharmacien (Université Paris V, 1975), Vétérinaire (Maisons-Alfort, 1976), Dr. Vétérinaire (1979, Faculté de médecine, Université Paris 12) a soutenu une thèse de 3e cycle en pharmacologie moléculaire (Université Paris VI, 1980) et un mémoire de doctorat d'Etat ès Sciences en microbiologie moléculaire (Université Toulouse 3, 1983).

Recruté en 1980 Assistant en Biochimie et Biologie Moléculaire à Faculté de Pharmacie de Toulouse, il est nommé Maître Assistant 2e et 1e classe en 1987 (février et juin) puis Professeur de Toxicologie en 1991 (PREX2 en 2008). Il a développé une recherche en pharmacologie moléculaire de médicaments antitumoraux et plus récemment en toxicologie génétique. Il a créé et dirigé (1991-2010) une équipe à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (UMR 5089 CNRS/Université), équipe labellisée par la Ligue contre le cancer (2003-2009), sur des projets de réparation des lésions l'ADN et de contrôle de la stabilité génomique. Il a été invité aux USA à la Texas Medical School (Houston 1985-1986) et au Lawrence Berkeley National Laboratory (Berkeley 2002- 2003). Il est co-auteur de plus de 130 publications et de 4 brevets. Il participe ou a participé à des conseils ou comités scientifiques toulousains des facultés de Médecine et de Pharmacie, de l'Université, de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse ainsi que du MESR, CNRS, Inserm, INRA, AERES et Communauté Européenne. Il est membre nommé du conseil scientifique de l'Inserm et du CES-Reach de l'Anses depuis 2012. Il a créé et dirigé (1992-2003) l'Ecole Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse et le master de cancérologie depuis 2005. Il a dirigé l'UR66 INRA Pharmacologie et Toxicologie en 2009-2010 et dirige actuellement l'unité TOXALIM créée en 2011. Il est membre titulaire de l'Académie Vétérinaire de France depuis 2013.

Coordinateur du Lot 2 : Florence Forget
Partenaire: INRA UR1264 MycSA

Brève description de l'unité:

Les études mises en œuvre au sein de l'unité de recherche UR1264 MycSA (30 permanents) concernent la contamination des cultures céréalières par les mycotoxines et en particulier les mycotoxines de *Fusarium*. L'expertise acquise concerne la connaissance et caractérisation de la flore fusarienne toxigène inféodée aux cultures céréalières ainsi que la connaissance des mécanismes de contamination des grains. Ces travaux profitent de la disponibilité d'un plateau analytique conséquent (comprenant un équipement LC/MSn), d'équipements QPCR mais aussi de la proximité sur le centre INRA Bordeaux d'une plateforme métabolomique très active. L'unité MycSA, en coordonnant plusieurs réseaux de recherche regroupant partenaires académiques et privés joue un rôle essentiel de structuration de la recherche en France sur les mycotoxines.

Chef de projet:

Florence FORGET-RICHARD, directrice de recherches à l'INRA, Directrice adjointe de l'unité MycSA (UPR1264, INRA Bordeaux) est Animatrice de l'équipes "mycotoxines" de l'unité MycSA depuis 2001. Son expertise et domaine de compétences concerne les " Métabolites secondaires des végétaux et champignons : impact sur la qualité des produits alimentaires". Depuis 12 ans, son activité de recherche est focalisée sur la thématique mycotoxines des céréales avec un accent plus particulier sur l'impact du stress oxydant sur la toxogénèse. Florence FORGET-RICHARD est actuellement coordinatrice du réseau FUSATOX (réseau national soutenu par l'INRA sur la genèse des contaminations en mycotoxines), du chantier "Mycotoxines" du réseau mixte technologique RMT QUASAPROVE soutenu par la DGER. De plus est à son actif l'animation et coordination au niveau région Aquitaine de projets de recherche sur les mycotoxines du maïs (projets Qualité sanitaire des aliments en Aquitaine) ainsi que des projets de collaboration avec des partenaires privés (projets CIFRE, partenaires impliqués : Biogemma, Euralis, Monsanto et Arvalis). Florence Forget-Richard est au centre d'un réseau de collaborateurs préoccupés par la thématique fusariotoxines, impliquant des chercheurs appartenant à des établissements publics et sociétés privés.

Coordinateur du Lot 3 : Rémi Servien

TOXALIM UMR 1331 INRA en partenariat avec l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, L'Ecole d'Ingénieurs Agronomes de Purpan et l'Université Toulouse 3.

Brève description de l'Unité:

Les compétences de l'unité TOXALIM couvrent des domaines scientifiques larges, allant de la physiopathologie digestive aux perturbations d'expression génique impliquées dans le développement de maladies métaboliques et de cancers. Elles s'appuient sur un savoir-faire de ses équipes, reconnu internationalement, en pharmacologie, chimie analytique, métabolomique, transcriptomique...

Ainsi, TOXALIM contribue à l'élaboration de connaissances sur les effets à long terme en santé humaine et animale de toxiques, tels que intrants agricoles, pesticides, mycotoxines, migrants d'emballage et autres contaminants alimentaires. Les projets relèvent plus particulièrement des expositions chroniques de contaminants à faible dose, éventuellement sous forme de mélanges et lors de phases critiques du développement des organismes (néonatal ou périnatal).

TOXALIM est fortement impliquée dans l'enseignement supérieur agro-vétérinaire et universitaire en toxicologie, au niveau master et doctorat, ainsi que dans le transfert de technologies et le partenariat avec les industriels de l'alimentation et du médicament vétérinaire. Au niveau régional, TOXALIM est au centre des activités du consortium PA3S (Pôle Aliment: Sécurité Sanitaire et Santé) et du GIS

Toulouse Agri-Campus, et collabore étroitement avec les deux Pôles de Compétitivité, présents dans son domaine de compétence: Agrimip Innovation et Cancer BioSanté.

Les équipes de TOXALIM sont impliquées dans de nombreux projets de recherche collaborative, tant au niveau national (ANR, PNRPE, ANSES...) qu'europpéen (FP6, FP7).

Chef de projet:

Le Dr Rémi Servien a obtenu une thèse en Biostatistique en 2010. Depuis 2012, il est chargé de recherche au sein de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Rattaché à l'UMR Toxalim, il est également chercheur associé au sein de l'Institut de Mathématiques de Toulouse (IMT). Au travers de ses différents travaux de recherche, il est devenu un expert dans la mise en place d'outils de modélisation adaptés aux données omiques. Il est également membre du conseil élargi de la Société Française de Statistique (SFdS).

Coordinateur du Lot 4 : Jean-Pierre Cravedi

TOXALIM UMR 1331 INRA en partenariat avec l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, L'Ecole d'Ingénieurs Agronomes de Purpan et l'Université Toulouse 3.

Brève description de l'Unité:

Les compétences de l'unité TOXALIM couvrent des domaines scientifiques larges, allant de la physiopathologie digestive aux perturbations d'expression génique impliquées dans le développement de maladies métaboliques et de cancers. Elles s'appuient sur un savoir-faire de ses équipes, reconnu internationalement, en pharmacologie, chimie analytique, métabolomique, transcriptomique...

Ainsi, TOXALIM contribue à l'élaboration de connaissances sur les effets à long terme en santé humaine et animale de toxiques, tels que intrants agricoles, pesticides, mycotoxines, migrants d'emballage et autres contaminants alimentaires. Les projets relèvent plus particulièrement des expositions chroniques de contaminants à faible dose, éventuellement sous forme de mélanges et lors de phases critiques du développement des organismes (néonatal ou périnatal).

TOXALIM est fortement impliquée dans l'enseignement supérieur agro-vétérinaire et universitaire en toxicologie, au niveau master et doctorat, ainsi que dans le transfert de technologies et le partenariat avec les industriels de l'alimentation et du médicament vétérinaire. Au niveau régional, TOXALIM est au centre des activités du consortium PA3S (Pôle Aliment: Sécurité Sanitaire et Santé) et du GIS Toulouse Agri-Campus, et collabore étroitement avec les deux Pôles de Compétitivité, présents dans son domaine de compétence: Agrimip Innovation et Cancer BioSanté.

Les équipes de TOXALIM sont impliquées dans de nombreux projets de recherche collaborative, tant au niveau national (ANR, PNRPE, ANSES...) qu'europpéen (FP6, FP7).

Chef de projet:

Jean-Pierre Cravedi est toxicologue et directeur de recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) à Toulouse. Il dirige ou est impliqué dans divers projets de recherches concernant les perturbateurs endocriniens et les substances génotoxiques à faibles doses et en mélanges. Il a publié plus de 150 articles dans des revues internationales à comité de lecture, dont la majeure partie concerne la sécurité des aliments, la santé environnementale et l'écotoxicologie. Il est responsable des activités du département Alimentation Humaine de l'INRA en matière de sécurité chimique des aliments. Jean-Pierre Cravedi est membre de différents conseils scientifiques à l'INRA et à l'ANSES et a été membre du panel sur les contaminants de la chaîne alimentaire de l'EFSA de 2003 à 2013. Il a été membre de plusieurs comités et groupes de travail à l'AFSSA, l'AFSSET et l'ANSES et a présidé le groupe d'évaluation collective d'urgence (GECU) de l'ANSES sur le maïs NK603 en 2012.

Coordinateur du Lot 5 : Xavier Coumoul
Inserm UMR-S 747- Université Paris Descartes

Brève description de l'Unité:

L'unité Inserm UMR-S 747 (toxicologie, pharmacologie et signalisation cellulaire) a été créée en 2006. Elle comprenait à l'origine, 3 équipes spécialisées en toxicologie (R. Barouki), pharmacologie du cartilage (J-F. Savouret) et métabolisme du tissu adipeux (C. Forest) et possédant une expertise en signalisation cellulaire. La volonté affichée du directeur (R. Barouki) était de mettre en place une unité spécialisée en toxicologie et pharmacologie moléculaire. Trois nouvelles équipes sont venues renforcer celle-ci en 2010 apportant à la fois de nouveaux champs d'expertise (P. Nioche, équipe Avenir, biologie structurale ; Odile Kellermann, cellules souches et J. Bastin, recherche translationnelle et maladies mitochondriales) et de nouvelles techniques d'étude des voies de signalisation. En 2014, l'unité se renforcera une nouvelle fois, par l'accueil des équipes de Mounira Chelbi-Alix et Sebastien Nisole (interferon et signalisation), de Charbel Massaad (régulation de la myélinisation) et de Frédéric Charbonnier (pathologies des motoneurones). Elle interagit par ailleurs avec des équipes de chimie sur le site de la faculté des Saints-Pères et est considérée comme une unité de référence en matière de toxicologie sur le plan national.

Chef de projet:

Xavier Coumoul dirige désormais l'équipe 1 de l'unité Inserm UMR-S 747 rattachée à l'université Paris Descartes. Cette équipe a une expertise reconnue dans le domaine de la signalisation du récepteur Ah (ou AhR), utilisant à la fois des modèles in vitro (lignées cellulaires épithéliales, cultures primaires) et in vivo (modèles rongeurs, souris KO). Plusieurs projets de l'équipe se sont appuyés initialement sur des données produites par les omiques notamment la transcriptomique (lignées hépatiques). Plusieurs projets actuels reposent sur des collaborations étroites avec des plateformes d'omiques (transcriptome hépatique et dioxines, souris AhR KO et nerfs optiques, retardateurs de flamme et effets neurotoxiques). Xavier Coumoul travaillera avec les porteurs de lots n°4 et 5 de sorte à coordonner en parallèle la recherche de biomarqueurs de toxicité aux OGM avec l'analyse physiopathologique liée à ce type d'exposition et ainsi, à établir des corrélations.

Annexe 3**CV de Pierre –Antoine Gourraud, directeur de Methodomics****Pierre-Antoine Gourraud PhD MPH:**

Gérant, Diplômé d'un doctorat en Biologie, option Immunogénétique Epidémiologique et Sante Publique en 2005 et d'un diplôme d'Etudes Approfondies en Sante Publique (2001 Université Paris XI).

Compétences :

- Traitement des données : développement d'algorithmes de recherche de données manquantes, d'anomalies et de doublons et développement d'algorithmes de correction : imputation de données manquantes, correction des anomalies, traitement des doublons.
- Analyses statistiques des données
- Enseignement
- Partenariats Public- Privé

Expériences

Sept. 2008- Aujourd'hui : **Gérant Société Methodomics**

- Gestion de projet
- Intégration de données
- Modélisation de données
- Développement d'algorithmes de détection d'erreur et d'aide à la décision

2011 - Aujourd'hui : **Professeur Assistant à l'Université de Californie, San Francisco, USA**

- Médecine digitale translationnelle
- Médecine personnalisée
- Cohorte longitudinale maladie chronique (Sclérose en Plaques)
- Base de Données SQL et NoSQL- Cloud computing

2009 – 2011 : Chercheur Post-doctorant à l'Université de Californie, San Francisco USA

- Immunogénétique et Neurologie
- Imagerie cérébrale par IRM

2006 - 2008 : Assistant Hospitalo-Universitaire en épidémiologie au CHU de Toulouse - Université Toulouse III

- Recherche clinique
- Analyse de registres et cohortes

2003 – 2006 : Allocataire de Recherche, Inserm Unit 558 Immunogénétiques, Toulouse

- Santé publique, Immunogénétique

1999 – 2003 : Elève-Ecole Normale Supérieure, Lyon

- Biologie Mathématique

83 Publications.**Caroline Le Gall PhD:**

Biostatisticienne chef de projet, Diplômée d'un doctorat en Mathématiques Appliquées, option Statistique en 2002 et d'un diplôme universitaire en Epidémiologie délivrée par l'université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

Compétences :

- Traitement des données : développement d'algorithmes de recherche de données manquantes, d'anomalies et de doublons et développement d'algorithmes de correction : imputation de données manquantes, correction des anomalies, traitement des doublons.
- Intégration de données médicales
- Rédaction de spécifications et de documents de présentation

- Formation professionnelle et dans l'enseignement supérieur
- Analyse statistique des données
- Gestion de projets

Expériences :

Janv 2013 – aujourd'hui : Biostatisticienne – Chef de Projets - Methodomics

- Responsable du traitement et de l'analyse statistique des données
- Gestion de projets
- Recherche et développement de nouveaux algorithmes de traitement des données à visée décisionnelle
- Formatrice

2004-aujourd'hui : Vacataire à l'Université de Toulouse

- Méthodologie statistique
- Gestion de projets

2010-2012 : Consultante (auto-entrepreneur) en biostatistique

- Etudes épidémiologiques pour la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique : traitement des données et analyses statistiques
- Faculté de médecine de Toulouse : analyses statistiques

2010-2011 : Biostatisticienne (en détachement de la société Freescale)

- Pré-traitement et analyses statistiques de données biologiques et cliniques complexes (Inserm, Hôpital Saint Louis (financement INCa))
- Veille technologique sur les données biologiques à haut débit

2002-2012 : Statisticienne – Chef de projets – Freescale Semiconducteurs France SAS

- Responsable des analyses statistiques de la chaîne de fabrication de composants électroniques
 - Maintenance des bases de données en collaboration avec le département Système d'Information
 - Recherche de données manquantes et mise en place d'indicateurs de suivi
 - Identification des anomalies (doublons, données erronées) et correction à l'aide de procédures informatiques incluses dans les scripts générant des rapports statistiques automatiques
 - Analyses statistiques pour l'amélioration continue du procédé de fabrication
 - Responsable du déploiement des outils statistiques de la politique globale Zéro Défaut
- Auditeur interne
 - Rédaction de procédures
 - Contrôle de l'application des normes réglementaires
- Gestion de projets :
 - Certifiée Black Belt
 - Formatrice interne
 - Coordination de plusieurs équipes projet

2000-2002 : Ingénieur recherche en statistique – Contrat CIFRE entre Motorola et l'Université Paul Sabatier de Toulouse

- Algorithmes de détection de ruptures et Statistiques Spatiales – Application au diagnostic de défaillances dans un procédé de fabrication

13 publications.

Annexe 4

Description détaillée de GeneSpring 12.6

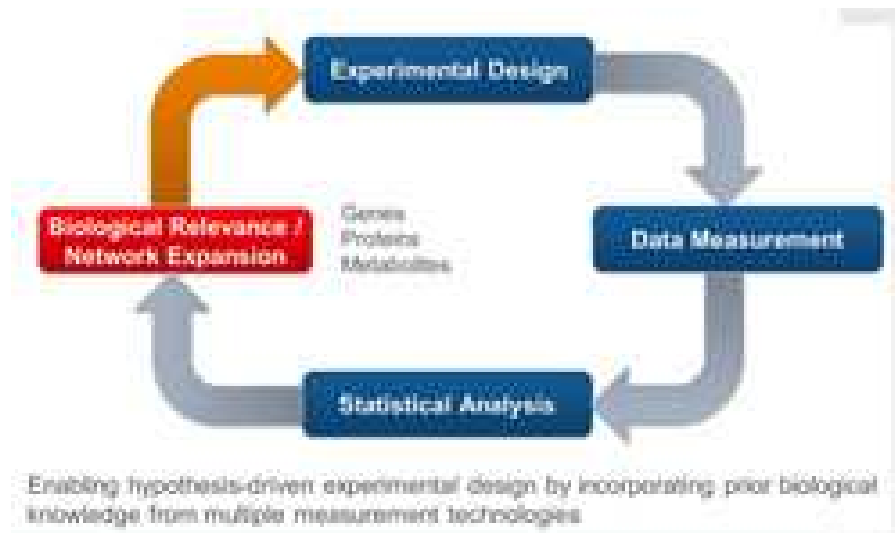
Introduction

GeneSpring provides powerful, accessible statistical tools for intuitive data analysis and visualization. Designed specifically for the needs of biologists, GeneSpring offers an interactive computing environment that promotes investigation and enables understanding of Transcriptomics, Metabolomics, Proteomics and NGS data within a biological context. Regarded as the gold standard in expression analysis, GeneSpring allows you to quickly and reliably identify targets of interest that are both statistically and biologically meaningful. GeneSpring has over 12,000 references in Google Scholar, including over 2000 in peer reviewed publications. GeneSpring is an expanding suite of integrated software applications for systems-level research, handling genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomics data in one unified application.



Multi-omic analysis with Agilent's GeneSpring Bioinformatics Suite

A key component of systems biology research involves producing heterogeneous data that measure various biological entities and events such as DNA structural variation, mRNA and microRNA expression, exon splicing, proteins and metabolites. GeneSpring 12.6, a part of Agilent's GeneSpring Analysis Platform, allows researchers to perform integrated analysis of such heterogeneous data, enabling them to identify linkages and data concordance that contribute to a more comprehensive understanding of the underlying mechanism of disease. The use of prior information is also critical in designing follow-up experiments. GeneSpring includes the ability to design next-phase experiments from pathway information, enabling hypothesis-driven experimental design by incorporating prior biological knowledge from multiple measurement technologies.



Integrative platform for multi-omic data analysis

GeneSpring addresses the challenges in multi-omic data analysis by providing comprehensive analytical and visualization tools for multiple data types. Heterogeneous data such as gene expression, miRNA, exon splicing, genomic copy number, genotyping, as well as proteins, and metabolites, can be combined into one project, allowing researchers to analyze, compare, and view results from different experiments in a single user interface (Figure 3). GeneSpring 12.6 facilitates integrative analysis through its translation function, linking probes across data types, array platforms, and organisms that map to the same biological entity. By supporting analysis and translation of multiple data types in a single application, GeneSpring 12.6 avoids common issues of software interoperability and faulty semantic mapping to increase a researcher's ability to find linkages between data types.



Pathway and network diagrams help place statistical results in a biological context. Direct navigation between biological pathways and their associated genes provides systems-level insight.

Annexe 5

Technical specifications for rodent feeding (first draft)

Background

1- Objective

The present program considers that tests and measurements performed in the context of the current 90d study 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 relevant early biomarkers of toxicity to improve the predictability of the 90d tests applied to plant GMOs. On the other hand, physico-chemical analysis of GMOs maize will be conducted using conventional analytical as well as omic techniques.

For this purpose, the program will conduct a 90d study extended to six months (for monitoring the occurrence of later effects) on groups of animals fed a GM plant (GMP) compared to groups of negative control animals (animals fed with genetically close non-GMO control plants). The animals will be exposed for a period of 6 months to MON 810 (Bt resistance) and NK603 (glyphosate resistance). The research is not intended to assess the health risks associated with the consumption of the specific GMP tested by humans or animals, which is part of the work of public health agencies. The approach we follow, namely the exploration of new parameters for monitoring animals during the 90-day test, will be to identify variations between groups. Meanwhile, the animal trial will have to be as closed 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.

2- Production, test and control crops

2-1- Production

Obtaining the appropriate genetic materials is one of the key steps of this project. This includes the transgenic materials but also the respective genetically closest non-transgenic materials. Two types of materials are planned to be considered and compared: MON 810 (production of Bt toxin) and NK603 (glyphosate resistance). The issue of the potential occurrence of unintended effects due to the genetic modification will be investigated by an acute characterization of PGM kernels compared to their respective non-PGM control.

2-2- Nature and source and culture of the PGM

As environmental conditions may lead to significant differences in composition that are not related to the genetic modification and as small variations in the diet of rats could significantly impact the toxicological data, it is essential that genetically modified plants are grown side by side in the same place by the same farmer in the same year with minimal pollen flow between lots. Kernels will be harvested from plants cultivated in 2014 in a country in which cultures of MON810 and NK603 are authorized. Contacts have been established to perform these cultures in Spain, in the US and Canada. For MON810, seed stocks of the transgenic variety (DKC6667-YG), a genetically close non-PGM variety (DKC6666) as the one used in the European GRACE project. We programmed a close interaction with the G-TwYST project (FP7-KBBE 2013.3.5-03 call). Therefore, both MON810 and NK603 will be produced for the two projects GMO90+ and G-TwYST. As in GRACE, plants MON810 and controls are cultivated in Spain (associated to IRTA and Universitat de Girona) in two different spots to avoid a potential effect of summer storms in the fields of production. Plants NK603 and controls are cultivated similarly in two different spots in America.

2-3- Comparative characterization of PGM and control kernels

Since genetic engineering could alter cellular metabolism in unintended and unanticipated ways, such as the loss of existing traits or the acquisition of new ones, it is essential to develop a complete strategy that will allow highlighting these potential unintended events. In addition, it will be necessary to have a quality control of the material purchased or donated at the beginning of the project.

In order to identify these events, we plan to carry out a comparative phenotypic analysis of the GM maize kernels and their counterpart combining physical, biochemical and microbiological approaches.

Each production will be analyzed and one of the each duplicate will be selected from the physical, biochemical and microbiological analysis and sent to the site of production of the pellets.

Thereafter, the biochemical approach will include for the selected production additional analysis with the metabolomics profiles .

The quality control will consist in (i) quantitative PCR analysis confirming the presence of the transgene in the GM kernels and its absence (below a defined level) in the non-GM kernels and (ii) a SNP analysis with a 50 K array to measure the closeness of the GM and nonGM material.

The phenotypic approach, analysis of contaminants (with the exception of trace elements) and the analysis of macronutrients (proteins, starch and cellulose) will be subcontracted to GermServices. Trace elements determination will be carried out by the INRA laboratory USRAVE. The metabolomic profiles will be acquired by the “metabolome platform” at Bordeaux (RMN, isoprenoids, lipids) and/or the profilomic society (RMN and LC-MS acquisitions).

2-4- Feed production and diets

The production and feed formulation will be done by Harlan Mucedola

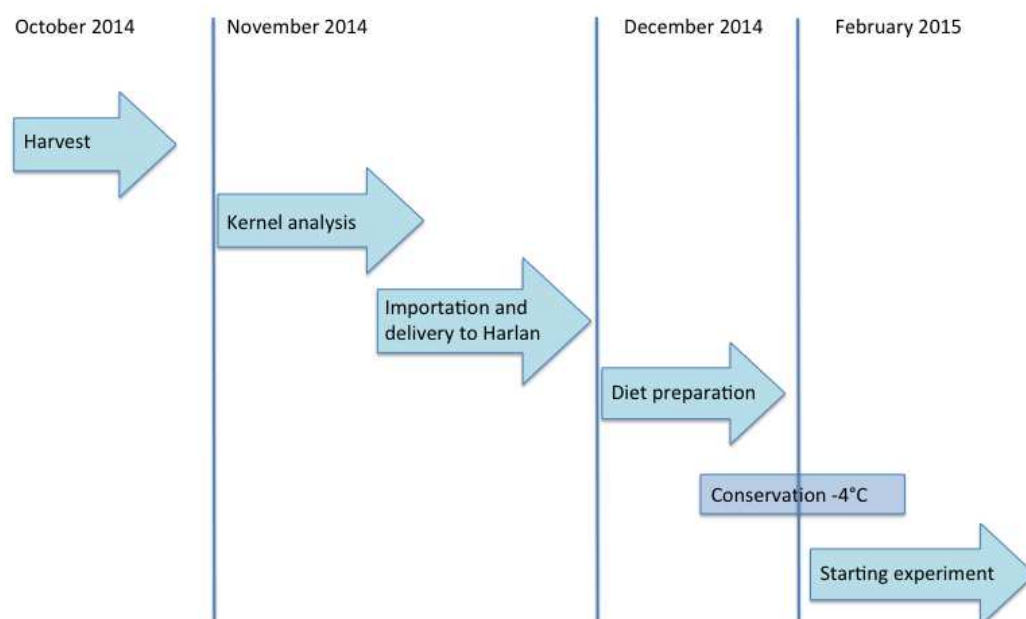
Nine diets (pelleted-diets) will be compared, integrating in their composition kernels from MON810 and its control, kernels from NK603, NK603 with glyphosate and NK603 control : 8 diets (Fig 1)

Fig. 1 : Group of rats fed with 8 different diets

	Dose (% w/w feed)					No of animals	
group	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
Total						240	240

Fig . 2 : Diet production timeline

harvest estimated date 15-30 october; results of the kernels analysis by mi November; importation and delivery to Harlan (Italy) end of November; diet preparation December (conservation in plastic bags - 30 kg each - at -4°C); starting experiment in february 2015 (pellet conservation at 4°C).



Composition of pellets will be investigated and followed during the whole experiment according to the analysis planned in table 1.

	Harvested dried kernels	Formulation/ pellets day 0	day 0+ 2 months	day 0 + 4 months	day 0 + 6 months
Physical characteristics					
1000 kernels weight	x				
% cracking	x				
% broken kernels	x				
Granulometry (size grading)		x			
"vitrosité"	x				
Contaminants					
Pesticides residues	x				
Traces elements (Cd, Pb, AS, Cr)	x				
Mycotoxins TCTB, fumonisins, Ochratoxin, aflatoxin, beauvericin, moniliformin, enniaines	x	x	x	x	x
Biochemical characteristics					
starch	x	x			
protein	x	x			
cellulose	x	x			

Metabolomic profiles					
RMN: amino acids, sugars	x	x	x	x	x
LC-MS: semi-polar compounds	x	x	x	x	x
Lipids and profile of fatty acids, dry matter on maize and pellets	x	x	x	x	x
isoprenoids	x	x	x	x	x
Quality control					
qPCR for transgene	x	x			
SNP analysis	x				

Table 1: Analysis workplan. In color (analysis that will be subcontracted)- The others will be achieved by the “plateforme metabolome de Bordeaux”.

EXPERIMENTAL FACILITIES

1- Animal welfare

The study will be conducted in accordance with EU Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22nd September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes as transposed in national law and approved in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.

1-1 Test facilities, human resources, time scheduling

The present study does not need to be a GLP study but a quality insurance system closed to the GLP recommendation will be strongly appreciated. Test facilities will have to be identified and localized. Precisions will be provided concerning health status, veterinary agreement of the animal facility. Human resources involved in the project will have to be namely identified as well as their function in the study. A time schedule will be provided.

1-2 Species and strain

In order to compare results of the present program with European program GRACE, GT-wYST and MARLON, we will use rat Wistar Rcc Han /Specific Pathogen Free (SPF) provided by HARLAN.

1-3 Number of animals

In accordance with the need of analysis and statistical relevance of the results, the number of animals have been set up to 480 divided into 8 groups including 30 males and 30 females. Females will be nulliparous and non-pregnant. A sentinel survey will have to be planned and explained.

1-4 Approximate weight and age

Upon arrival, the animals will weigh between 100-120g and will be 5 weeks old. The animals will be 6 weeks old at the start of the study and will weigh between 110-140g. Ideally, they should be born within 1-5 days of each other and be of uniform age and weight ($\pm 20\%$ of the mean).

1-5 Identification

Within the frame of treatment groups, each rat will be individually marked by appropriate system and ideally by microchip implant tagging. Whatever the system will be, it will be explained.

1-6 Animal housing

Precise localization and conditions of animals housing will be provided (room number, health status, temperature, pressure relative humidity, light/dark cycle, recording, type of cages,...). Precision on

cleaning procedures of the rooms of the animal facility as well as housing and feeding materials will be provided. Experimental unit: as recommended by the EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed (EFSA Scientific Committee, 2011), two animals of the same gender will be housed per cage and the cage taken as the experimental unit. Use separate rooms for male and female.

2- Experimental design

2-1 Animal receipt and acclimation

Describe receipt and acclimation conditions. In particular, time of acclimation, housing conditions, health status evaluation, weighting will be provided.

2-2 Quality assurance

An external quality auditor (one partner of the consortium) will be involved in each critical phase: repartition of the rats, definition of sub groups

2-3 Randomization

Describe randomization procedure and housing conditions for the experimental procedure. In order to minimize the chance of mistakes being made, we strongly recommend that cages of the same treatment groups will be clustered in vertically arranged groups, which will be rotated on a regular basis (once per week). Each vertical row of cages (within the same dose group) will be rotated from top to bottom. Racks will be rotated clockwise every two weeks within the original room configuration.

2-4 Group allocation and dosing

Prior to the start of treatment on study day 1, parameters of the detailed examination of all animals will have to be provided. Before the sampling procedure, mean weight differences between each group (same gender) should be less than 10%

2-5 Diets

Diets are coded in a “double blind” fashion by the diet-producing company (Mucedola srl.). Samples of the diets are coded with different codes than the diets themselves. The coding scheme is shared with the study monitor and Bernard Salles (the company’s contact within the GMO90+ consortium). It is to be kept confidential and therefore not to be distributed further among. Diets will be encoded from 1 to 8 by the food supplier

In order to avoid any biased observations, animal house staff will have to be “blind” with respect to the identity of the diets. For this instance, the different feeds will be coded and labelled by the food provider and the code will be given only to the person in charge of diet analysis. All others will be blinded to the feeds. A detailed table will be provided to explain general experimental design (blind identification of group, reference diet, GM, non GM, conventional, number of male and female animals per group).

Samples of diets will be sent to the analytical laboratories contracted for the analysis of the composition after 3 and 6 months experimental time.

Storage will be carried out in cold room at 4°C

2-6 Route of administration

The route of administration will be the oral route as this route is the most appropriate for the safety assessment of foods. The test item (maize) will be administered by incorporation into the diet since this mimics most human exposure to these foods. Attention should be paid that there will be no nutritional imbalances as a result of dietary incorporation of the test item. Food will be supplied ad libitum. Feed consumption will have to be determined weekly for 6 months (provide the proposed methodology).

3- Periodical health status observations

Rats will be inspected daily for changes in skin, fur, eyes, mucous membranes, occurrence of secretions and excretions as well as activity level and change in behaviour.

3-1 Morbidity, mortality

A description of procedure in case of moribund or dead animals will have to be provided (isolation, observation frequency, necropsy...).

3-2 Clinical signs

The frequency and the type of observations, as well as the procedure in case of clinical signs will have to be provided.

3-3 Detailed physical examination

The frequency and the type of observations, as well as the procedure in case of deviations from normal will have to be provided.

3-4 Functional assessment

The frequency and the type of observations, as well as the procedure in case of deviations from normal will have to be provided.

3-5 Body weight

Each animal will have to be weighed at the following times: 1) 48 hours after arrival, 2) on the first day of feeding, 3) weekly during the study period, 4) at the termination of the study, 5) in the event of an early death or sacrifice in extremis.

4- Procedures for sample collection

Sample collection for the following analyses will have to be done: haematology, blood and urine chemistry, omics, and pathology. Samples collected will include blood, urine, tissues and organs.

Blood samples will be divided for haematology, clinical chemistry and omics.

Urine samples will be collected for omics

Tissues and organs will be removed and evaluated by histology and omics.

Sample collection and tissue processing will have to be provided (euthanasia process, type of sampling, animal transport, weighting, sample storage,...). In particular, euthanasia procedure will have to take into account specific samplings such as blood sampling for hormonal studies.

Explain personal disposition for conducting the sampling: how to proceed, number of rats per day, randomization procedure, tagging...

From each group of 30 rats:

10 will be euthanized at 90d (group 1). Urine and blood sampling will be performed on the group of 20 that will be euthanized at 180d (group 2). Group 2 is divided in two (10 rats per subgroup) 2a and 2b, the subgroup being used for the 24h hours urine samples.

Timing of the sampling

Group 1 (10 rats): blood T0

Group 1 (10 rats): blood, histology and organs collection at T90

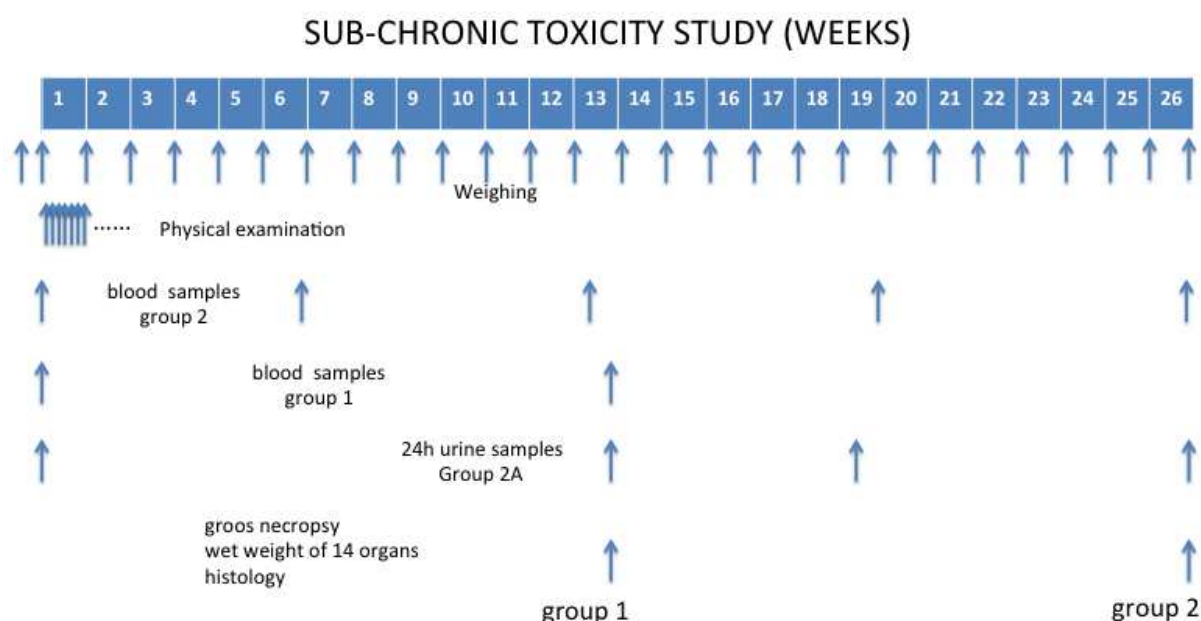
Group 2 (20 rats): Blood T0, T90, T135, part of the euthanasia process T180

Group 2a (10 rats): Urines T0, T90, T135, part of the euthanasia process T180

Group 2 (20 rats): histology and organs collection at T180

Blood : 1 ml (or 5 ml during the euthanasia process) will be collected in heparinised vials which will be centrifuged at 3000 g at 4°C for 15 min.

For each animal, after collecting blood in one heparinised vial, samples will be kept not more than 15 min at 4°C before starting centrifugation to separate red cells from plasma. Plasma will be aliquoted in 500 µL eppendorff tube under 75 µL volume plus the remaining plasma. Aliquots will be kept at -80°C.



Organs for Omics and histology:

Liver will be excised and weighed. The right lateral lobe will be collected and immediately snap frozen in liquid nitrogen. Liver samples will be stored in 1.5 ml Eppendorf vials or seemingly equivalent containers.

Both kidneys will be dissected and weighed. The third to the half higher part of the right kidney will be cut and immediately snap-frozen in liquid nitrogen. Kidney samples will be stored in 1.5 ml Eppendorf vials. The dissection of kidneys will be done by the same person to ensure consistency and reproducibility.

Organs for histology examination

Intestinal and spleen samples will be dissected: Intestinal sections of mid-jejunum, ileum, ascending colon (1cm each minimum), mesenteric lymph nodes from ileum and ascending colon (3 lymph nodes each minimum). Intestinal and spleen samples will be dissected: Spleen, intestinal sections of mid-jejunum, mid-ileum, ascending colon (2cm each), superior mesenteric and ileocolic lymph nodes (2 ileocolic and 1 superior mesenteric lymph nodes). This will be done by the same person to ensure consistency and reproducibility.

After preparation all samples will be frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C. • Blood, plasma and tissue samples will be sent on dry ice to the Inserm or INRA laboratories for analysis. Each sample must be clearly and unambiguously identified by the animal number/nature of the sample (e.g. liver, kidneys, plasma). Aliquots are to be set aside so that these can be used in case of problems with transport of samples shipped from the animal testing facility to other test sites.

4-1 Hematology

Erythrocyte Count (RBC) - Haematocrit (HT) - Haemoglobin (Hb) - Mean Corpuscular Haemoglobin (MCH) - Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCHC) - Mean Cell Volume (MCV) - Leukocyte Count (WBC) - Differential Leukocyte Count - Platelet Count (PLT) - Activated Partial Thromboplastin Time - Prothrombin Time (PT) from citrate-treated plasma.

4-2 Clinical chemistry

Parameters will include total protein (TP), albumin (ALB), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALKP), creatinine (CREA), urea, fasting blood glucose, total bilirubin (TBIL), total cholesterol, triglycerides, Na, K, Ca, Cl, P.

4-3 Omics

Profilomic will use plasma samples (group 2A)

Laberca will use plasma samples (group 2A)

Axiom will use urine samples (group 2A)

TRIX will use liver and kidney tissue (group 1 and 2) ; RNA extraction will be done in the Inserm 747 unit

4-4 Pathology

Organs and tissues preserved in neutral buffered 10% formalin for histopathological evaluation. Complete microscopic examination of the tissues listed above will be performed in accordance with the OECD TG 408 on the groups fed with the high dose (33%) and the control groups (groups 1-3-4-6-8).

4-5 Gross necropsy

A complete necropsy will be performed on all animals at study termination on day 90 and 180. The weight of organs will be recorded in line with OECD guideline 408 and organs/tissues will be examined macroscopically for any deviations from normal (in accordance with ŠPP / TOX / V005).

The wet-weight of the following organs will be recorded:

liver, heart, lungs, kidney, spleen, pancreas, testes, uterus, ovary, stomach, intestine, epididymis, adrenal glands and thymus

Histological evaluation of tissue specimens will be done in each animal.

The tissues will be preserved in the fixative medium (neutral buffered 10% formalin) for histopathological examination for gross lesions.

Tissue specimens include:

brain (representative regions including cerebrum, cerebellum , medulla/pons and pituitary) / spinal cord / thyroid / parathyroid / thymus / oesophagus / aorta / salivary glands / stomach / small intestine / pancreas / large intestines (including Peyer's patches) / liver / kidneys (L, R) / adrenals / spleen / heart / trachea and lungs (inflated with fixative and then immersed in formalin) / gonads (testes, L, R; ovaries L, R) / uterus/ female mammary glands / prostate / urinary bladder / lymph nodes: submandibular and mesenteric / peripheral nerve (sciatic or tibial) preferably in close proximity to the muscle / section of bone marrow and/or a fresh bone marrow aspirate skin from the back will be taken from the same area of each rat

Additional tissues may need to be investigated based on clinical or any other findings.

Also any organs/tissues that are likely to be considered as target organs based on the known toxicological properties of the test material should be preserved.

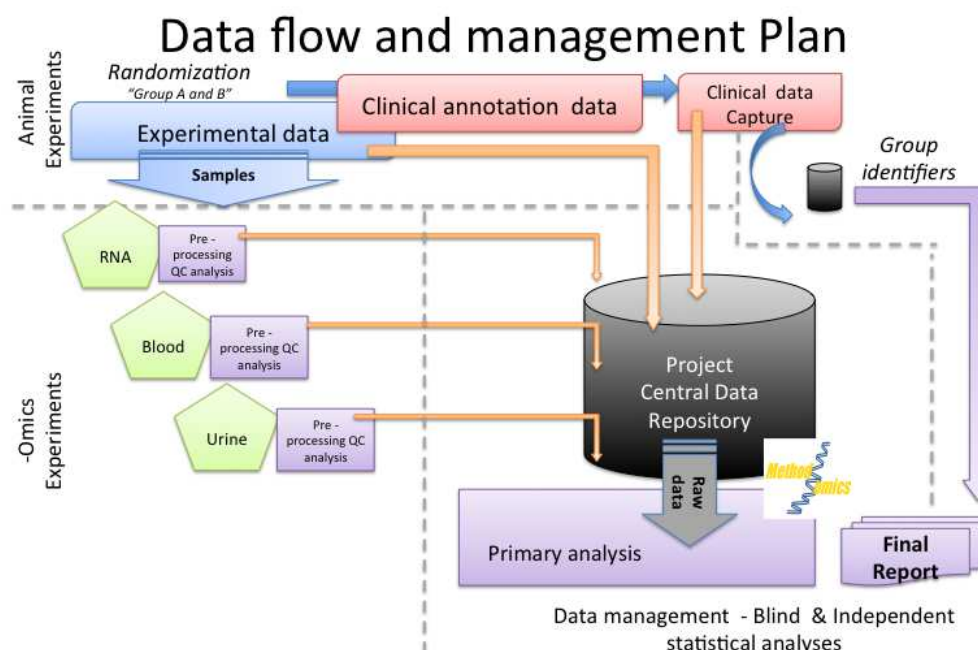
Parts of specific organs will be snap frozen in liquid nitrogen in order to allow additional examinations.

4-6 Histopathology

Organs and tissues preserved in neutral buffered 10% formalin will be examined for histopathological evaluation. Complete microscopic examination of the tissues listed below will be performed on all the animals from each group in accordance with the OECD TG 408: liver, kidney, testis, ovary, stomach, intestine, epididymis, adrenal glands, pancreas

4-7 Data evaluation statistical analysis

The statistical analysis will be done by the statistical team (WP4)



As a first step the data will be screened for any obvious errors and outliers. Outliers will be checked against the original paper records. Outliers which are not due to transcription or other obvious types of error will be retained, but noted. The statistical analysis will then be done with and without the outliers. If the conclusion depends on the presence of one or more outliers, then this will require further investigation on a case-by-case basis. If an outlier makes no difference to the conclusions, it will be retained.

Data from males and females will be analysed separately and together (ANOVA).

Summary statistics (e.g. “n”, means, standard deviations and/or medians and quartiles, as appropriate), will be tabulated based on the cage means (as the cage is considered the experimental unit in this study). A one-way analysis with planned or post-hoc comparisons will be used to evaluate statistical significance of each outcome (trait). In some cases more detailed statistical analysis including correlations between characters or even a multivariate analysis may be needed, but this should be decided on a case-by-case basis. Methods of analysing longitudinal data such as growth and food consumption will be decided on a case-by-case basis.

Tables of results (means, SDs and statistical significance; raw individual data) will be prepared and in some cases additional statistical analyses and graphical methods may also be used. The raw data will be made publically available on the web site.