

**VETAGRO SUP**  
**CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2014 - Thèse n°

***ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTICOAGULANTS CHEZ  
LE RAT BRUN (R.NORVEGICUS) : CONSEQUENCES DE  
L'EMPLOI D'UN RODENTICIDE DE SECONDE GENERATION  
SUR LA BIOACCUMULATION ET L'EVOLUTION DE LA  
RESISTANCE. ETUDE DANS DEUX FERMES DE RHONE-  
ALPES***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 13 juin 2014  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par  
*Hélène Defrance*  
Née le 12/12/1989  
à Noisy-le-sec (93)



VetAgro Sup





## LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Civilité	Nom	Prénom	Unité pédagogique	Grade
M.	ALOGNINOVA	Théodore	Pathologie du bétail	Professeur
M.	ALVÈS DE OLIVEIRA	Laurent	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	ARTOIS	Marc	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	BARTHÉLÉMY	Anthony	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
Mme	BECKER	Claire	Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	BELLI	Patrick	Pathologie morphologique animaux de compagnie	Maître de conférences Contractuel
Mme	BELLUCO	Sara	Pathologie morphologique animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	BENAMOU-SMITH	Agnès	Équine	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Biologie fonctionnelle	Professeur
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Biologie fonctionnelle	Professeur
Mme	BOULOCHER	Caroline	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	BOURDOISEAU	Gilles	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	BRUYÈRE	Pierre	Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Maître de conférences Contractuel
M.	BUFF	Samuel	Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Maître de conférences
M.	BURONFOSSE	Thierry	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	CACHON	Thibaut	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
M.	CADORÉ	Jean-Luc	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Professeur
Mme	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	CAROZZO	Claude	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	CHABANNE	Luc	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	COMMUN	Loïc	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Gestion des élevages	Maître de conférences Stagiaire
Mme	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	DEMONT	Pierre	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	DESIARDINS-PESSON	Isabelle	Équine	Maître de conférences Contractuel
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	ESCRIOU	Catherine	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
M.	FAU	Didier	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	FOURNEL	Corinne	Pathologie morphologique animaux de compagnie	Professeur
M.	FRANCK	Michel	Gestion des élevages	Professeur
M.	FREYBURGER	Ludovic	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Ridha	Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	GÉNEVOIS	Jean-Pierre	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	GRAIN	Françoise	Gestion des élevages	Professeur
M.	GRANCHER	Denis	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	GRÉZEL	Delphine	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	GUÉRIN	Pierre	Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Professeur
Mme	GUÉRIN -FAUBLÉE	Véronique	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
M.	JUNOT	Stéphane	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	KECK	Gérard	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences Stagiaire
M.	LACHERETZ	Antoine	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LAMBERT	Véronique	Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Pathologie du bétail	Maître de conférences
Mme	LEBLOND	Agnès	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Équine	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Équine	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	MARCHAL	Thierry	Pathologie morphologique animaux de compagnie	Professeur
Mme	MIALET	Sylvie	Santé Publique et Vétérinaire	Inspecteur en santé publique vétérinaire
Mme	MICHAUD	Audrey	Gestion des élevages	Maître de conférences Stagiaire
M.	MOUNIER	Luc	Gestion des élevages	Maître de conférences
M.	PÉPIN	Michel	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	PIN	Didier	Pathologie morphologique animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	PONCE	Frédérique	Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	PORTIER	Karine	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Stagiaire
Mme	PROUILLAC	Caroline	Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
Mme	RÉMY	Denise	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
M.	ROGER	Thierry	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
M.	SABATIER	Philippe	Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	SÉGARD	Émille	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel

Mme	SERGENTET	Delphine	Santé Publique et Vétérinaire	Maitre de conférences
Mme	SONET	Juliette	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maitre de conférences Contractuel
M.	THIÉBAULT	Jean-Jacques	Biologie fonctionnelle	Maitre de conférences
M.	VIGUIER	Éric	Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Pathologie morphologique animaux de compagnie	Maitre de conférences Contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Santé Publique et Vétérinaire	Professeur

## Remerciements

A monsieur le professeur Olivier Monneuse de la faculté de médecine de Lyon, pour avoir aimablement accepté la présidence de cette thèse,  
Hommages respectueux,

Au professeur Philippe Berny, pour m'avoir proposé ce sujet et m'avoir aidé à toutes les étapes de ce travail,  
Un immense merci,

Au professeur Michel Pépin, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse,  
Remerciements,

A madame Isabelle Fourel de Biolytics à Marcy l'étoile, pour toute son aide lors des extractions moléculaires et ses explications malgré mon ignorance des méthodes analytiques,  
Merci de votre patience,

A mes parents et ma famille, pour leur soutien durant ces années d'études,

A ma super coloc' Isabelle, pour ta bonne humeur quotidienne,

A Sandrine, Claire, Céline, Lola et les autres, pour les bons moments en cliniques et les gâteaux du vendredi,

A Blanche, merci pour vos récits, votre éternelle jeunesse et vos talents de cuisinière,

Aux éleveurs des deux fermes concernées par ce travail, merci de nous avoir permis de travailler dans vos exploitations,

A Aurélien Merville pour les conseils prodigués lors des piégeages sur le terrain,  
Sincères remerciements,

A ceux que j'oublie mais qui se reconnaîtront,

Merci à tous,

## Sommaire

INTRODUCTION .....	13
I. ETAT ACTUEL DES RESISTANCES.....	14
A. Rappel du mécanisme d'action des AVK .....	14
B. Etat des lieux des résistances en laboratoire.....	15
1. Définition de la résistance.....	15
2. Mécanismes de résistance .....	16
3. Mutations connues.....	17
4. Evaluation de la résistance.....	18
C. Etat des connaissances de la résistance sur le terrain .....	19
II. PROTOCOLE DE L'ESSAI TERRAIN .....	22
A. Sites d'étude.....	22
B. Choix des AVK utilisés pour les essais .....	23
C. Etapes de l'expérimentation .....	24
D. Méthode de dosage des AVK .....	27
1. Modalités générales de dosage.....	27
2. Principes mis en jeu sur la chaîne analytique.....	30
E. Méthode d'évaluation de la résistance .....	35
F. Evaluation du statut génétique d'une population .....	35
G. Analyse statistique des résultats.....	36
III. RESULTATS OBTENUS ET CONSEQUENCES.....	37
A. Evaluation initiale du site de Marcy et choix du brodifacoum.....	37
B. Efficacité des piégeages à chaque étape sur les deux sites .....	39
1. Nombre de rats obtenus à chaque étape.....	39
2. Résultats de l'évaluation des populations au poulailler.....	40
C. Echantillonnage .....	42
1. Au poulailler .....	42
2. A Marcy.....	45
3. Bilan d'échantillonnage sur les deux sites.....	47
D. Résultats obtenus par les microsatellites.....	48
E. Evaluation de la bioaccumulation .....	48
1. Evolution des concentrations en AVK au poulailler .....	49

2.	Evaluation des concentrations en AVK à Marcy.....	54
3.	Bilan général des résultats des deux sites.....	58
F.	Evolution de la résistance.....	59
1.	Au poulailler .....	59
2.	A Marcy.....	60
3.	Bilan général des résultats de résistance .....	62
4.	Etude de l'impact clinique de la résistance.....	62
IV.	CONSEQUENCES DES RESULTATS OBTENUS .....	66
A.	Une persistance des rats malgré les traitements.....	66
B.	Une contamination durable du site par les AVK .....	66
C.	Traitements et intoxications secondaires .....	68
D.	Enfin, comment contrôler une population de rats ? .....	69
1.	Une utilisation raisonnée des AVK .....	69
2.	Méthodes adjuvantes aux AVK.....	72
	CONCLUSION .....	74
	BIBLIOGRAPHIE.....	75
	ANNEXE 1.....	82
	ANNEXE 2.....	83
	ANNEXE 3.....	85
	ANNEXE 4.....	92



## Table des figures

Fig. 1 : Site d'action des AVK dans le cycle de la vitamine K1 .....	15
Fig.2 : Déjections de rats au poulailler, témoins de la présence de rats.....	22
Fig.3 : Galeries creusées au poulailler .....	23
Fig.4 : Galeries à Marcy .....	23
Fig.5 : Tapette à rats.....	26
Fig.6 : Echantillon dans l'acétone après broyage.....	29
Fig.7 : Evaporation à l'azote .....	29
Fig.8 : Echantillon dans le vial, prêt à être injecté en LC/MS .....	29
Fig. 9 : Chaîne analytique utilisée.....	30
Fig. 10 : Allure d'un chromatogramme .....	31
Fig. 11 : Eléments de la chaîne HPLC.....	32
Fig.12 : Etapes principales de la chromatographie HPLC .....	32
Fig. 13: Schéma des étapes en spectrométrie de masse .....	34
Fig. 14 : Répartition des poids (g) des rats piégés.....	42
Fig. 15 : Répartition des tailles (cm) des rats piégés .....	42
Fig.16 : Taille (cm) en fonction du poids (g) des rats piégés juste après le 1 <sup>er</sup> traitement .....	43
Fig.17 : Taille en fonction du poids des rats piégés 6 mois post 1 <sup>er</sup> traitement.....	43
Fig.18 : Taille en fonction du poids 8 mois post 1 <sup>er</sup> traitement.....	44
Fig.19 : Taille en fonction du poids juste après le 2 <sup>ème</sup> traitement .....	44
Fig.20 : Taille en fonction du poids des rats piégés 3-5 mois post 2 <sup>ème</sup> traitement .....	44
Fig.21 : Répartition des poids (g) des rats piégés tout au long de l'essai.....	45
Fig.22 : Répartition des tailles des rats piégés sur l'essai .....	45
Fig.23 : Relation taille/poids au point 0 .....	46
Fig.24 : Relation taille/poids en post-traitement immédiat.....	46
Fig.25 : Relation taille/poids 6 à 8 mois après traitement .....	46

Fig. 26 : Part de chacune des classes d'âge sur les deux sites.....	47
Fig.27 : Variation des médianes des concentrations en diféthialone selon les étapes de l'essai. Echelle logarithmique.....	50
Fig. 28 : Variations des médianes de concentrations en bromadiolone, en difénacoum et en brodifacoum. Echelle logarithmique .....	52
Fig.29 : Variations des concentrations en bromadiolone et brodifacoum aux trois étapes de l'essai .	55
Fig. 30 : Evolution de la fréquence de présence de l'allèle de résistance chez les rats piégés selon les étapes de l'essai .....	59
Fig. 31 : Boîte d'appâtage.....	70
Fig.32 : Plan du poulailler 1 tel que tenté sur le site <a href="http://www.baytool.de">www.baytool.de</a> .....	72

## Table des tableaux

Tab.I : Etapes de l'essai au poulailler .....	24
Tab.II : Etapes de l'essai à Marcy.....	24
Tab.III : Résultats du point 0 (T0) à Marcy, concentrations en ng/g. ....	38
Tab.IV : Etapes de l'essai au poulailler .....	39
Tab.V : Etapes de l'essai à Marcy .....	39
Tab.VI : Evaluation de la population au poulailler, juin 2012. ....	40
Tab.VII : Evaluation de la population au poulailler 4 mois post-traitement. ....	41
Tab. VIII : Répartition des différentes classes d'âge sur les deux sites .....	47
Tab. IX : Médianes des masses (g) des rats selon les sites et les classes d'âge.....	48
Tab. X: Réduction des concentrations (en ng/g) en diféthialone.....	49
Tab. XI : Médianes des concentrations en AVK (ng/g) selon les étapes de l'essai.....	50
Tab. XII : Résultats du test de Kruskal-Wallis au poulailler .....	53
Tab.XIII : Réduction des données en ng/g au point « 0 ».....	54
Tab.XIV : Médianes des concentrations (ng/g) en AVK aux différentes étapes de l'essai .....	55
Tab. XV : Résultats du test de Kruskal-Wallis à Marcy .....	56
Tab. XVI : Réduction des concentrations obtenues en brodifacoum à long terme, 6-8 mois post traitement .....	57
Tab.XVII : Evaluation des génotypes des rats piégés au cours de l'étude au poulailler .....	59
Tab.XVIII : Test du $\chi^2$ d'ajustement.....	60
Tab. XIX : Fréquences de présence de l'allèle de résistance à Marcy .....	60
Tab.XX : Test du $\chi^2$ pour l'étude à court terme .....	61
Tab.XXI : Test du $\chi^2$ pour l'étude à long terme .....	61
Tab.XXII : Test du $\chi^2$ d'ajustement pour l'étude long terme sur les deux sites .....	62
Tab.XXIII : Rats répondants aux critères de sélection pour la mise en relation de la clinique avec le statut génétique.....	63

Tab.XXIV : Table de contingence pour le test exact de Fisher ..... 64

## INTRODUCTION

Les premiers raticides anticoagulants (antivitamine K ou AVK) sont mis sur le marché dans les années 1950. Rapidement, des populations de rats commencent à persister malgré les traitements effectués, notamment au coumatène. Cette prolifération pose à nouveau le problème des maladies transmises par le rat à l'homme et aux animaux, incluant notamment la leptospirose, et implique une accumulation d'AVK chez les rongeurs d'où un risque potentiellement mortel pour leurs prédateurs, par intoxication secondaire. La notion de résistance est introduite, et la base génétique de ce phénomène est mise en évidence, bien que le gène support ne soit identifié que beaucoup plus tard.

La synthèse d'une nouvelle génération d'AVK, avec des molécules plus efficaces et plus persistantes a permis de dépasser la résistance, au prix d'un risque toxicologique accru. A ce jour, aucune résistance aux molécules de dernière génération n'est démontrée *in vitro*.

Dans le travail effectué ici, dans deux fermes de Rhône-Alpes, nous avons suivi des populations de rats sur plusieurs mois voire années, afin de mettre en évidence un stockage des AVK dans les terriers et la contamination prolongée notamment au sein de nouvelles populations qui s'installent en un site, suite à un traitement et à l'élimination de la population initiale de ce site. De plus, nous avons étudié l'influence de traitements anticoagulants sur la modification de la fréquence allélique de résistance : des traitements successifs ont-ils pour conséquence une augmentation de la prévalence de la résistance ?

La première partie sera consacrée à un état des lieux du phénomène de résistance et de ses mécanismes, aussi bien *in vitro* que sur le terrain. Nous exposerons ensuite les hypothèses du travail mené, le protocole utilisé, les résultats obtenus et leurs conséquences quant à l'attitude à adopter face à une infestation de rats.

# I. ETAT ACTUEL DES RESISTANCES

## A. *Rappel du mécanisme d'action des AVK*

Au début des années 1950, la première génération d'anticoagulants est créée, avec notamment le coumafène et le coumatétralyl. Les doses létales 50% (DL50) sont de l'ordre de 10 à 50 mg/kg. Le développement de résistances nécessite la synthèse d'une nouvelle génération de molécules, appelées les superwarfarines, ou seconde génération. La DL50 est alors abaissée à 0,2-3,9 mg/kg. Ces molécules plus récentes sont efficaces après une seule ingestion et ont des demi-vies bien plus élevées que celles des molécules de première génération. Ainsi, la demi-vie du coumatétralyl est de 55 jours, contre 220 jours pour le flocoumafène, molécule de seconde génération [12]. Ces différences de toxicité et de rémanence dans le foie permettent d'établir une première classification des anticoagulants [30]. La première génération d'AVK comprend donc le coumafène, le coumatétralyl, la diphacinone et la chlorophacinone ; la seconde génération est constituée de la bromadiolone et du difénacoum pour ce qui est des composés les plus anciens, les molécules les plus récentes étant le brodifacoum, la diféthialone et le flocoumafène.

Une autre classification est basée sur la structure chimique des molécules. On distingue les hydroxycoumarines - coumafène, bromadiolone, coumatétralyl, flocoumafène, brodifacoum, et difénacoum - qui possèdent un noyau 4-hydroxycoumarine, les indanediones, dont la chlorophacinone et la diphacinone, avec un noyau 1,3 indane-dione [30], et enfin les benzothiopyranones dont la diféthialone est le seul représentant [3].

Ces AVK perturbent la synthèse de certains facteurs de coagulation, les facteurs II, VII, IX et X. En effet, les AVK ont pour principale cible la vitamine K époxyde réductase (notée VKOR), enzyme qui catalyse la réduction de la vitamine K1 époxyde en quinone [30,17]. Ainsi, en présence d'AVK, la vitamine K1 n'est pas recyclée selon le cycle hépatique théorique ci-après, et la carboxylation des résidus glutamiques des facteurs II, VII, IX et X n'a pas lieu, d'où des facteurs restant inactifs et une insuffisance de coagulation. Le temps de prothrombine, qui explore la voie exogène de la coagulation, avec les facteurs II, V, VII, X et le fibrinogène, est notamment augmenté.

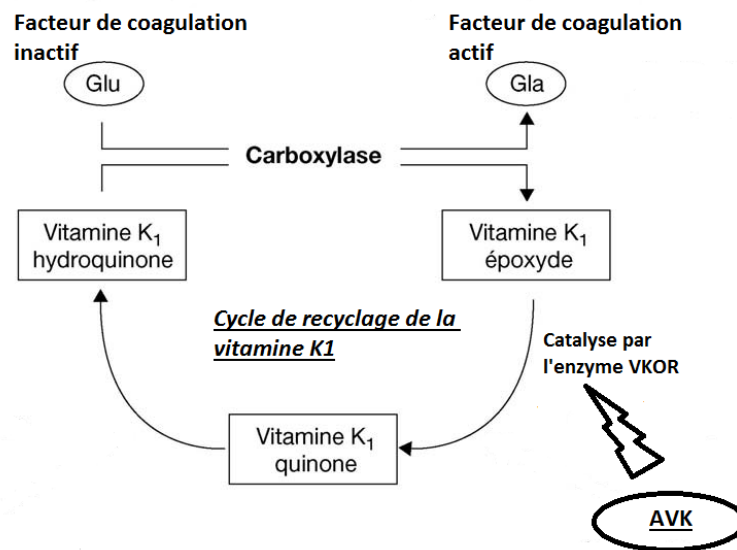


Fig. 1 : Site d'action des AVK dans le cycle de la vitamine K1, d'après [12]

Les résultats des études de cinétique enzymatique laissent supposer un modèle d'inhibition non compétitive des AVK sur VKOR [22]. VKORC1 correspond au composant majeur du complexe VKOR qui à lui seul permet la réduction. Les AVK interagissent avec VKOR, protéine de 163 acides aminés, possédant quatre domaines transmembranaires. Le gène codant correspondant est situé sur le chromosome n°1 du rat, sur le n°7 chez la souris et sur le n°16 chez l'homme ; on note ce gène *vkor* [24].

## B. Etat des lieux des résistances en laboratoire

### 1. Définition de la résistance

La résistance clinique est définie par un manque d'efficacité quand l'usage du produit est correct, conformément aux recommandations du fabricant [3]. *The European and Mediterranean Plant Protection Organization* postule « que des rongeurs résistants aux anticoagulants sont susceptibles de survivre à des doses d'anticoagulants qui devraient tuer des congénères 'normaux' ou 'sensibles' » [2]. Une première description de ce phénomène de résistance date de 1958, en Ecosse. De nombreuses études de ce phénomène sont réalisées

en Allemagne, au Danemark, au Royaume-Uni et en France, car les résistances y sont fréquentes.

On choisit de retenir la définition suivante de Greaves (1994) de la résistance au sens strict : « La résistance aux anticoagulants est une perte majeure d'efficacité de ces derniers lors d'une utilisation correcte dans les conditions normales. Cette perte d'efficacité est due à la présence de lignées de rongeurs possédant une sensibilité aux anticoagulants notamment réduite et transmissible génétiquement » [7].

## 2. Mécanismes de résistance

Dès 1973, Bell et Caldwell postulent qu'une mutation est responsable d'une diminution de l'affinité de VKORC1 pour le coumafène [30]: le recyclage des facteurs de coagulation continue d'avoir lieu, malgré la présence d'anticoagulants.

Kazuyuki, Yusuke *et al.* montrent, par modélisation à partir de séquences mutées de *vkor*, que la distance moléculaire entre VKOR et le coumafène est plus grande chez les rats résistants. Comme le taux de transfert des électrons diminue avec la distance entre les centres d'oxydoréduction, l'interaction entre le coumafène et l'enzyme est moins forte, et la réaction d'oxydo-réduction au niveau du site catalytique continue d'avoir lieu [42].

De plus, le site catalytique de VKORC correspond à un motif Cys (132)-X-X-Cys (135). Lorsqu'une mutation a lieu en position 139 du gène *vkorc1*, comme c'est fréquemment le cas en France, le changement de conformation consécutif à la mutation modifie la structure tridimensionnelle du site catalytique, par proximité spatiale de la mutation avec le site actif. L'activité de l'enzyme est alors diminuée [17]. Nous verrons plus loin que les rats résistants ont généralement des besoins accrus en vitamine K1 ; leur carence est notamment due à une faible activité de VKOR et donc à un moindre recyclage de la vitamine K1.

Lorsqu'une mutation est présente au niveau du gène *vkorc1*, la catalyse enzymatique est moins efficace en présence d'AVK de première génération dans le milieu d'expérimentation. Les  $V_{max}$  sont diminuées chez ces rats résistants [42]. En revanche, la constante d'inhibition ( $K_i$ ), qui indique la capacité d'un AVK à inhiber le fonctionnement de VKORC1, est fortement augmentée pour les AVK de 1<sup>ère</sup> génération (coumafène), faiblement pour la bromadiolone et le difénacoum, peu ou pas pour les AVK les plus récents comme le brodifacoum [14].



La résistance aux AVK est donc liée aux mutations touchant *vkorc1*, mais aussi à l'activité des cytochromes P450. Markussen, Heiberg et Fredholm ont comparé les profils d'expression génétique de six cytochromes P450 (Cyp 2a1, Cyp 2c12, Cyp 2c13, Cyp 2e1, Cyp 3a2, Cyp 3a3) chez des rats bruns réputés sensibles et chez des rats résistants. Leur statut sensible ou résistant a été établi suite à des *feeding tests*, expliqués plus loin. Ils montrent que les rats résistants expriment plus les gènes des cytochromes P450 que les rats sensibles. Or, ces hémoprotéines interviennent dans la détoxification du coumafène par hydroxylation de ce dernier en dérivés monohydroxylés ; une augmentation de l'activité cytochrome P450 diminue donc la proportion de coumafène actif, composé toxique [28]. On peut donc suspecter l'existence d'une résistance à support métabolique, dont l'importance est cependant bien moindre que la résistance liée à VKORC1.

### **3. Mutations connues**

La plupart des résistances sont liées à une mutation du gène codant VKORC1. Ce gène *vkorc1* correspond à une séquence de 1800 pb, contenant trois exons [3,28]. De nombreuses mutations touchent ce gène, en des localisations différentes. Une étude de 2005 sur une souche de rats française a montré l'existence de sept mutations affectant *vkorc1* [23]. Au Japon, au moins neuf mutations de *vkorc1* sont connues [41]. Depuis 2009, dix huit nouvelles mutations ont été mises en évidence par une étude portant sur plus de 250 rats. Ces résistances affectent l'activité de VKORC1 de façon notable et variable ; ainsi, la substitution Trp59Arg entraîne la disparition de 84% de l'activité VKORC1 [38].

En France, la mutation la plus fréquente est dite Y139F ; il s'agit de la substitution en position 139 du gène *vkorc1* d'une tyrosine par une phénylalanine [14]. Cette mutation est mise en évidence par PCR, le substrat étant le plus souvent un doigt ou une oreille de rat. La transmission de la résistance chez le rat brun est autosomique co-dominante [33]. C'est cette mutation que nous recherchons sur les rats piégés pour cette étude.

#### 4. Evaluation de la résistance

La résistance est cliniquement évaluée par la réponse au test BCR (*Blood-Clotting Response test*) : différentes concentrations connues d'AVK (multiples de la dose efficace 50% -ED50- dont la valeur est établie pour les différents AVK) sont inoculées à des rats, anciennement par voie sous-cutanée ou intra péritonéale, maintenant par gavage. Leur temps de Quick est mesuré 24 heures après administration. Ce temps de Quick est converti en INR, pour *International Normalized Ratio*, via la courbe de calibration. Cet indice INR, utilisé pour évaluer la coagulation chez l'homme, a l'avantage d'évaluer le temps de Quick en s'affranchissant des variations de mesure liées au réactif utilisé pour le test. On obtient la courbe de calibration par mesure des temps de Quick sur des rats sensibles et non traités, sur des dilutions successives de plasma. On compare ensuite les temps de coagulation mesurés sur des rats traités avec des concentrations d'AVK connues à la courbe de calibration, et un INR supérieur à 5 indique une résistance clinique [35, 36, 2 et 7]. Une étude de Baert *et al.* (2012) a montré qu'un rat peut être qualifié de résistant au coumafène par un test BCR positif sans pour autant qu'une mutation ne soit présente au niveau du gène *vkor*. Ceci est à mettre en lien soit avec une très forte sensibilité du test, soit avec une résistance à support cytochrome P450. Retenons malgré tout que la valeur prédictive positive du test BCR est forte [2].

Des *feeding tests* sont réalisés dans certaines études : les rats sont nourris plus de six jours avec des appâts contenant 50 mg d'AVK/kg d'appât, ceux qui survivent à plus de cinq jours de test sont qualifiés de résistants [3]. Ces *feeding tests* ont été systématisés par les recommandations de l'OMS de 1982, mais sont de moins en moins utilisés, pour des raisons éthiques.

Des manipulations *in vitro* sont également faisables : on mesure soit l'activité VKOR - donc le Km, le Ki et la Vmax, comme vu précédemment - soit le métabolisme des cytochromes P450 à partir de microsomes hépatiques. Cependant, l'approche la plus récente et la plus fiable est la mise en évidence par PCR de SNP (pour *single nucleotide polymorphism*) sur le gène *vkor*, qui sont associés à des mutations connues, elles mêmes entraînant de la résistance. Cette dernière méthode est la plus utilisée aujourd'hui.

Il est à noter que les tests de résistance en laboratoire ne concernent actuellement que la résistance au coumafène et au sens large aux anticoagulants de première génération par réactions croisées, aucune résistance aux anticoagulants les plus récents n'est démontrée à ce jour.

### ***C. Etat des connaissances de la résistance sur le terrain***

La résistance aux anticoagulants est aujourd'hui une grande problématique; une étude menée à Tokyo révèle que 80% des rats sauvages de la ville sont résistants au coumafène [42].

L'étude réalisée par Pelz et Klemann en 2004 en Allemagne a montré les résultats suivants : dans deux fermes, traitées de façon identique au coumatétralyl pendant 21 jours, suivis de trois semaines de non traitement, puis retraitées pendant 43 jours au difénacoum, les auteurs ont réalisés des tests BCR. Seuls 2 des 18 rats piégés sont sensibles, 89% des rats sont résistants au coumafène, 83% sont résistants à la bromadiolone et 56% le sont au coumatétralyl. A l'issue du premier traitement au coumatétralyl, 45% de la population initiale de rats est toujours présente, d'où une très faible efficacité du traitement. Parmi les survivants au premier traitement, quatre rats ont consommé une dose supérieure à la DL50 [32]. Les taux de résistance dans ces deux fermes sont donc élevés.

Une étude anglaise, menée dans le Hampshire dans les années 1980s [15], étudie l'efficacité de la bromadiolone et du brodifacoum sur des populations de rats résistants au difénacoum, résistance évaluée par des *feeding tests* et qui ne s'observe que sur des rats déjà résistants au coumafène, avec une résistance croisée. Les auteurs travaillent sur 18 fermes, traitées au brodifacoum, à la bromadiolone, ou au difénacoum. Il y a échec du traitement dans les six fermes traitées au difénacoum, succès sur uniquement deux des six fermes traitées à la bromadiolone. Les traitements au brodifacoum sont efficaces mais la courbe de la fréquence de prise d'appât en fonction du temps pour le brodifacoum montre que la consommation d'appât persiste à des niveaux non nuls suite au début du traitement (60% de prise d'appât au 14<sup>ème</sup> jour de traitement) [15]. Les auteurs posent donc la question d'une éventuelle résistance de ces rats au brodifacoum et à la bromadiolone, qui n'est pas confirmée par les essais menés au laboratoire.

Les situations sont donc variées selon les conditions du terrain, mais les phénomènes de résistance sont de plus en plus présents et entravent l'efficacité des traitements anticoagulants.

Il est à noter que les résistances précédemment évoquées sur le terrain ont été testées par tests BCR ou par *feeding tests*, tandis que nous ne considérerons dans notre étude que des résistances relatives au coumafène via la mutation Y139F et testées par PCR. Cette méthode d'évaluation de la résistance est plus standardisée et plus éthique. De plus, Grandemange *et al.* [14] ont démontré que cette mutation, seule, introduite dans une population de rats sensibles suffit pour obtenir une résistance en tout point comparable à celle des populations sauvages.

Un travail de caractérisation des mutations en termes de « pouvoir de résistance » est à effectuer pour toutes les mutations identifiées sur le terrain [14]. Le travail de Hodroge *et al.* [17] sur cinq mutations de *vkor* fréquentes en Europe (Y139F, Y139C, Y139S, L120Q et L128Q) a en effet montré que toutes ces mutations n'ont pas le même impact lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygotes, les Ki sont très variables pour une même exposition à un AVK donné.

Nous venons donc de montrer la forte prévalence des résistances aux anticoagulants sur le terrain. La situation française a fait l'objet d'un travail particulier par le biais de l'analyse des SNP sur des rats prélevés lors d'une enquête nationale [14]. Ce travail a mis en évidence la fréquence de la résistance - notamment via la mutation Y139F, la plus fréquente - ainsi que la forte prévalence d'individus homozygotes résistants.

Dans le travail de terrain effectué ici, dans deux fermes de Rhône-Alpes, nous sommes partis du constat suivant : lorsque l'on traite avec une molécule récente, très efficace, on élimine tous les rats si on suppose d'une part une absence de résistance à ces produits, ce qui est décrit *in vitro*, et d'autre part une bonne consommation. Le foyer est ensuite vite recolonisé par une nouvelle population, dont les rats consomment les éventuels restes du traitement effectué précédemment. Cette nouvelle population peut être suivie sur le long terme, par piégeages successifs.

L'objectif de ce travail se décline alors en deux grandes questions :

- D'une part, en matière de résidus et de risque de toxicité secondaire, est-ce que la molécule utilisée pour le traitement anticoagulant est retrouvée dans les foies des rats de la nouvelle population ? Si oui,
  - Est-ce-que cette nouvelle population piégée est bien distincte de la population initiale? Si c'est le cas, les rats de la population initiale ont stocké des restes d'appâts dans leurs terriers car, après traitement, les appâts placés de façon visible ne sont plus retrouvés.
  - Quelles concentrations peuvent être dosées sur leurs foies ?
  - Pendant combien de temps post-traitement mesure-t-on des concentrations non nulles de cette molécule sur les foies de rats ?
- D'autre part, est-ce-que des traitements successifs, bien qu'effectués avec des molécules puissantes et pour lesquelles il n'y a pas de résistance décrite, augmentent la pression de sélection par la mutation Y139F et finalement la fréquence de présence de l'allèle de résistance sur le terrain?

## II. PROTOCOLE DE L'ESSAI TERRAIN

### A. Sites d'étude

L'étude est menée dans deux fermes du département du Rhône, un poulailler formé de trois bâtiments à Savigny-nommé poulailler dans la suite- et un élevage de vaches laitières – nommé Marcy dans les bases de données- qui comprend également un poulailler et des clapiers (ces derniers correspondent au site « E » de la base de données).

Le premier poulailler a été choisi pour son infestation récurrente par les rats, ce qui augmente la réussite du piégeage, mais aussi en raison de son utilisation de longue date pour des essais de terrain par l'équipe de recherche, ce qui garantit une traçabilité des traitements antérieurs effectués et permet une utilisation de données obtenues précédemment (site suivi d'octobre 2011 à décembre 2012).

La deuxième ferme a été choisie en raison de sa proximité, de l'infestation récurrente par les rats, qui ne rétrocede pas aux traitements conseillés par le groupement de défense sanitaire (bromadiolone essentiellement), et bien sûr de la motivation des éleveurs à éradiquer les rats.

L'attrance des rats pour ces deux fermes peut s'expliquer par la présence constante de grains, notamment au niveau des poulaillers, voire d'autres ressources alimentaires telles que les lapereaux dans les clapiers ou les céréales des bovins.



Fig.2 : Déjections de rats au poulailler, témoins de la présence de rats



*Fig.3 : Galeries creusées au poulailler*



*Fig.4 : Galeries à Marcy*

## ***B. Choix des AVK utilisés pour les essais***

Le poulailler a déjà été traité en octobre 2011 à la diféthialone, et des tests de résistance par PCR quantitative ont montré une très forte prévalence de la résistance antérieure à tout traitement. Comme notre but est d'éliminer toute la population initiale afin d'étudier une éventuelle accumulation des AVK restants par une nouvelle population, une molécule très efficace devait être employée; on privilégie la diféthialone.

A Marcy, la situation est différente, l'étude débute en février 2012 sans aucune analyse préalable. On réalise un point 0 par piégeage de rats afin d'évaluer la fréquence de présence de l'allèle de résistance et de faire un état des lieux des molécules anticoagulantes déjà présentes dans les foies des rongeurs piégés, avant tout traitement de notre part. Les résultats,

expliqués plus loin, nous font choisir le brodifacoum comme molécule anticoagulante pour le traitement à Marcy.

### ***C. Etapes de l'expérimentation***

Voici un aperçu des étapes de l'essai sur les deux sites, données d'abord sous forme de tableaux pour plus de clarté. Ces étapes sont expliquées en détails par la suite.

Tab.I : Etapes de l'essai au poulailler

<b>Période</b>	<b>Opération effectuée</b>
<b>Octobre 2010 à février 2011</b>	Point « 0 » initial
<b>1er traitement diféthialone</b>	
<b>Octobre 2012</b>	Piégeage immédiatement post 1 <sup>er</sup> traitement à la diféthialone
<b>Avril 2012</b>	Piégeage 6 mois post 1 <sup>er</sup> traitement
<b>Juin 2012</b>	Evaluation population + point « 0 », 8 mois post 1 <sup>er</sup> traitement
<b>2<sup>ème</sup> traitement diféthialone</b>	
<b>Juillet 2012</b>	Piégeage immédiatement après le 2 <sup>ème</sup> traitement diféthialone
<b>Octobre à décembre 2012</b>	Evaluation population + piégeage 3-5 mois post 2 <sup>ème</sup> traitement

Tab.II : Etapes de l'essai à Marcy

<b>Période</b>	<b>Opération effectuée</b>
<b>Mars 2012</b>	Point « 0 »
<b>Traitement brodifacoum</b>	
<b>Avril 2012</b>	Piégeage en post traitement immédiat au brodifacoum
<b>Octobre à décembre 2012</b>	Piégeage 6-8 mois post traitement



A noter par rapport au calendrier ci-dessus que le service de toxicologie de l'école a réalisé l'étude au poulailler d'octobre 2010 à avril 2012. Mon intervention a commencé en juin 2012 au poulailler, et en mars 2012 à Marcy.

Préalablement à mon étude, et afin de confirmer la persistance de rats au poulailler, une évaluation de la population de rats est réalisée début juin 2012. Du blé est déposé dans des plateaux, en quantités connues. Un rat consomme en moyenne 25g par jour, moins pour les jeunes, et on peut estimer à 20g la consommation quotidienne d'individus issus d'une population de rats avec des jeunes de l'année. Chaque jour, la quantité consommée est évaluée, ce qui donne une idée de la population présente. On réalise ces relevés pendant cinq jours, les quantités sont mesurées avec un verre doseur : la mesure est peu précise mais il s'agit surtout d'évaluer de façon globale la population. Les plateaux ont été placés au poulailler quelques jours avant le début de l'évaluation de la population. En effet, la néophobie chez le rat est tout particulièrement liée à la nouveauté du contenant de l'aliment, bien plus qu'à la nouveauté de l'aliment lui-même. Dans l'étude menée par Inglis *et al.* [19], la consommation de l'aliment habituel chute drastiquement lorsqu'il est placé dans un nouveau contenant, par rapport à la consommation de ce même aliment placé dans le contenant habituel. La consommation ne ré-augmente qu'à partir du sixième jour suivant la mise en place du nouveau contenant, tout en restant significativement inférieure à la consommation dans le contenant habituel. Sur huit groupes de rats étudiés, trois groupes n'ont commencé à consommer l'aliment qu'au-delà du huitième jour.

Suite à l'évaluation de la population, on effectue le point 0 sur les deux sites. Cette étape nous permet d'avoir un aperçu des éventuelles molécules anticoagulantes présentes dans les foies des rats piégés avant d'effectuer le traitement, comme expliqué précédemment. On piège ainsi 28 rats à Marcy, et 14 rats au poulailler, le piégeage s'effectue soit avec des pièges métalliques, soit avec des tapettes, comme illustré ci-après. A noter que ce point 0 au poulailler est réalisé en juin 2012, huit mois après le précédent traitement à la diféthialone.



Fig.5 : Tapette à rats

Du beurre de cacahuète est utilisé dans les pièges et sur les tapettes, en guise d'appât.

Au point 0 succède le traitement, respectivement à la diféthialone fin juin 2012 au poulailler et au brodifacoum fin mars 2012 à Marcy. Nous utilisons des appâts colorés, que l'on place au fond des trous creusés par les rats, tout en les laissant visibles, ou dans des boîtes d'appâtage lorsque les espèces non cibles de la ferme pourraient avoir accès aux appâts. Une étude argentine de 2009 [26], concernant majoritairement la souris *Mus musculus*, montre qu'il n'est pas nécessaire de placer des appâts dans des lieux très éloignés des bâtiments d'élevage ; en revanche, il convient de placer du raticide dans le bâtiment d'élevage et dans le périmètre qui l'entoure. Ce périmètre correspond dans l'étude à la zone clôturée qui entoure les bâtiments. Nous avons ainsi placé des appâts autour des bâtiments à Marcy ; il n'a pas été possible d'en faire autant au poulailler car aucune clôture ne sépare les bâtiments de la voie publique ce qui présente un risque vis-à-vis des espèces non cibles, humaines ou animales.

En post-traitement immédiat, les rats morts sont ramassés tous les jours, sur chacun des sites. Cette phase a duré de trois semaines à un mois, nous arrêtons lorsque, lors de plusieurs visites de suite, aucun rat n'est retrouvé et que la consommation d'appât cesse.

Dans une étude de terrain utilisant de la bromadiolone [37], datée de 1981, les auteurs notent une consommation maximale d'appâts au deuxième jour de traitement. Pour nos essais, un intervalle de quelques jours a été laissé entre la pose des appâts et les premiers relevés, afin de laisser les rats s'adapter aux appâts, éléments nouveaux dans leur environnement. Il n'est donc pas possible de vérifier ici ce maximum de consommation à deux jours, situation qui

serait d'autant plus difficile à comparer qu'il ne s'agit pas ici de bromadiolone, et qu'une très forte compétition alimentaire vis-à-vis de l'aliment du bétail est présente.

Pour l'étude de l'impact à long terme de l'utilisation d'AVK et afin de laisser le temps à une nouvelle population de s'installer, nous ne retournons pas sur le terrain pendant 4 mois au poulailler et 7 mois à Marcy en recommandant aux éleveurs d'éviter l'emploi de tout AVK et de contacter l'équipe en cas d'infestation nouvelle. Ces différences de durées s'expliquent de la façon suivante : par soucis d'organisation, recommencer en même temps l'étude sur les deux sites était souhaitable, et les éleveurs à Marcy n'ont pas noté la présence de rats jusque fin octobre 2012. Une nouvelle estimation de la population est faite sur 12 jours au poulailler : les rats sont revenus, la consommation augmente au fur et à mesure des jours (les résultats de cette étape sont donnés plus loin).

Pour chaque rat piégé vivant, l'euthanasie est faite au CO<sub>2</sub>. Le rat est ensuite pesé, mesuré et sexé. Puis l'autopsie est pratiquée, la présence d'éventuelles hémorragies est notée, le foie est prélevé de même qu'un doigt, une oreille et une portion de queue par rat, en vue de la réalisation des tests de résistance par PCR et de suivi génétique par analyse des microsatellites.

## ***D. Méthode de dosage des AVK***

### **1. Modalités générales de dosage**

Les AVK sont dosés à partir du foie des rats. Une portion de celui-ci est prélevée, pesée et broyée dans l'acétone, solvant ayant une forte affinité pour les lipides. En effet, la structure des AVK leur confère une lipophilie marquée. La partie lipidique de l'échantillon est extraite selon le protocole figurant en annexe 4. Les extraits lipidiques obtenus sont introduits dans la chaîne analytique LC-MS/MS, méthode qui combine la chromatographie en phase liquide puis la spectrométrie de masse (cf ci-dessous). Cette méthode permet de doser huit AVK- le coumafène, le coumatétralyl, la chlorophacinone, la bromadiolone, le difénacoum, le flocoumafène, le brodifacoum et la diféthialone- à partir d'une concentration de 10 ng/g de substrat.

L'ordre d'analyse des échantillons dépend de la dose attendue d'AVK. Ainsi, les échantillons provenant de rats piégés juste après les traitements sont supposés *a priori* très fortement contaminés par les AVK et sont dosés en dernier, pour limiter au maximum les contaminations entre les échantillons, bien que l'aiguille prélevant l'analyte (voir ci-après) soit rincée entre deux échantillons successifs.



*Fig.6 : Echantillon dans l'acétone après broyage*



*Fig.7 : Evaporation à l'azote*



*Fig.8 : Echantillon dans le vial, prêt à être injecté en LC/MS*

## 2. Principes mis en jeu sur la chaîne analytique

Cette chaîne analytique repose sur l'utilisation de deux techniques successives : la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse. L'analyse est entièrement automatisée une fois la programmation réalisée par l'opérateur : les différents échantillons contenus dans les « vials » sont placés sur un plateau ; l'automate réalise le prélèvement nécessaire sur chaque échantillon, l'analyse est conduite et un signal est transmis en fin de chaîne à l'ordinateur qui traite les données. Lorsqu'une analyse est terminée, l'automate passe à la suivante.

L'objectif des analyses est, d'une part, de détecter la présence des différents anticoagulants dans les échantillons, mais aussi d'en déterminer la quantité, donnée en ng/g (unité ppb utilisée dans les tableaux de résultats de dosage plus loin).



Fig. 9 : Chaîne analytique utilisée

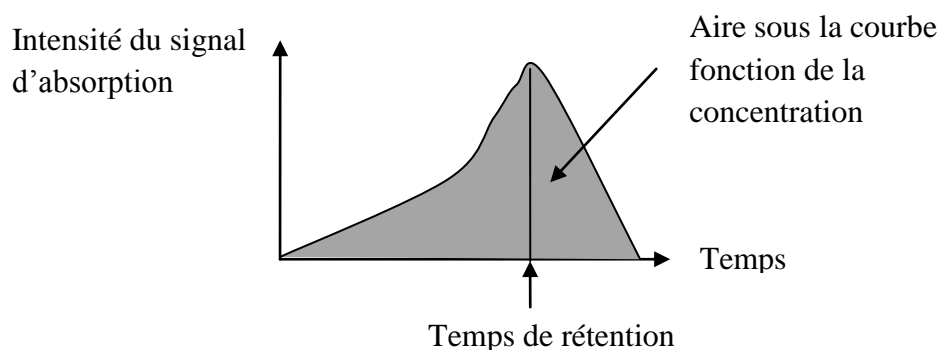
### a) Chromatographie en phase liquide

Le principe de cette méthode repose sur les différences d'affinité des différentes molécules de l'échantillon avec la phase stationnaire. Ces molécules migrent avec la phase mobile : plus leur affinité pour la phase stationnaire est forte, moins vite elles atteindront l'extrémité de la colonne.

Dans notre cas, la phase stationnaire est constituée de billes poreuses de silice greffée. La phase mobile se compose d'un mélange entre une phase aqueuse - ici de l'acétate d'ammonium à 10 mmol/L - et une phase organique, on utilise ici de l'acétonitrile. Lorsque l'analyte, correspondant à un volume de 1  $\mu$ L de l'échantillon, arrive dans la colonne de chromatographie, des liaisons hydrogènes se créent avec la phase stationnaire ; l'établissement de ces liaisons est favorisé par la proportion plus grande de la phase aqueuse au sein de la phase mobile en début d'analyse. Cette proportion diminue ensuite, pour favoriser la migration des molécules : c'est le gradient d'éluion. Comme les molécules n'ont pas toutes la même affinité pour la phase stationnaire, elles n'arrivent pas toutes au même moment à l'extrémité de la colonne : la durée mise par chaque molécule pour traverser la phase stationnaire est son temps de rétention, il permet de distinguer les molécules et est mesuré par un détecteur. Le temps de rétention est soumis à plusieurs facteurs de variation, dont les dimensions de la colonne, la dimension des billes de silice, la dimension des pores des billes, la température de la colonne, et la composition de la phase mobile.

Un pic chromatographique est obtenu après le passage de la phase mobile au niveau du détecteur, ce qui permet de tracer le chromatogramme. La mise en correspondance de ce dernier avec la courbe de calibration permet la détermination des concentrations des espèces recherchées.

Pour établir la courbe de calibration, des foies de rats non exposés aux AVK sont supplémentés avec des concentrations connues d'AVK, de 1 à 20000 ng/g. Cette courbe d'étalonnage est le tracé des aires sous les pics d'absorption émis en fonction de la concentration en AVK des échantillons analysés.



*Fig. 10 : Allure d'un chromatogramme*



Plateau avec solvants

Dégazeur

Pompe binaire deux voies : phase organique et phase aqueuse

Echantillonneur automatique : « vials » disposés dans l'ordre prédéfini sur le logiciel

Colonne de chromatographie

Fig. 11 : Eléments de la chaîne HPLC

La pompe fléchée a plusieurs rôles : elle pompe la phase mobile pour qu'elle gagne la colonne, est responsable de la création du gradient d'élution et crée une pression positive dans la colonne. On parle alors de HPLC pour *High Pressure Liquid Chromatography*.

Finalement, à l'issue de la chromatographie, les molécules de l'échantillon sont séparées, et chacune est caractérisée par son temps de rétention. Les molécules entrent alors dans le spectromètre de masse.

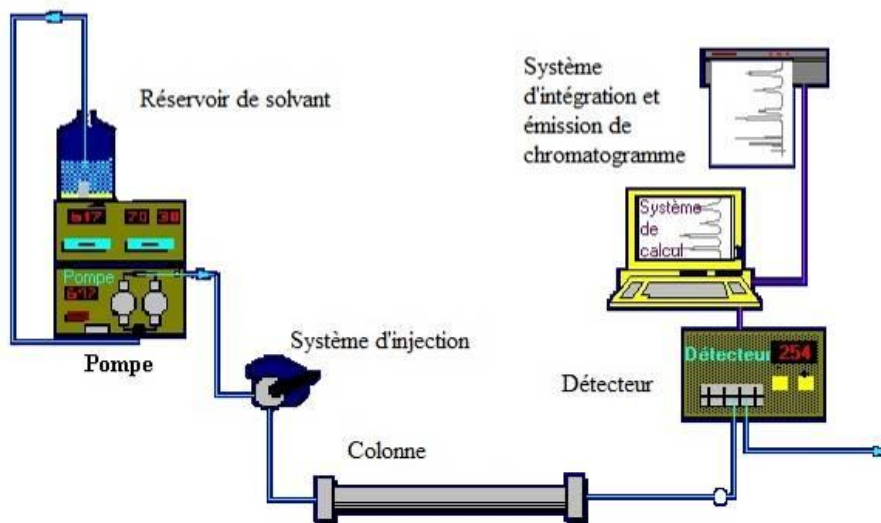


Fig.12 : Etapes principales de la chromatographie HPLC, d'après [1]



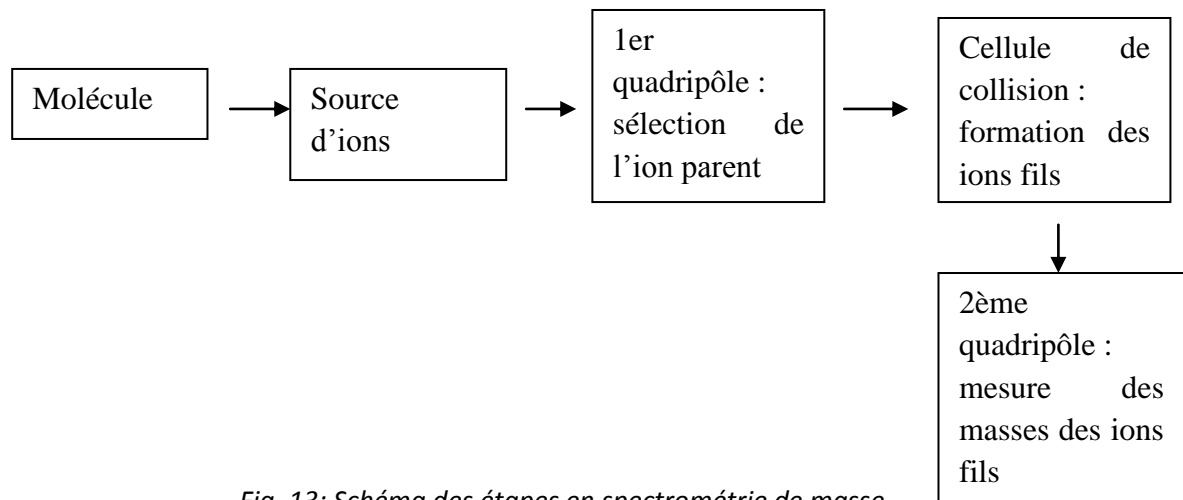
## **b) Spectrométrie de masse**

Cette fois-ci, le principe est le suivant : il y a séparation des espèces ionisées, chacune des espèces obtenues étant caractérisée par sa masse moléculaire.

Ici, ce sont des molécules qui entrent dans le spectromètre de masse. Elles vont être ionisées dans la source d'électrospray située à l'entrée du spectromètre ; la phase mobile liquide est transformée en un spray de fines gouttelettes chargées électriquement.

Une fois les molécules ionisées, elles sont soumises à un champ électrique dans lequel elles n'ont pas toutes la même trajectoire, trajectoire qui est caractéristique de leur masse. Elles sont ensuite séparées en fonction de leur masse, selon deux possibilités : le scan - l'appareil détecte les masses de tous les ions - ou le filtre de masse, qui ne laisse passer qu'une seule masse, choisie par l'opérateur. C'est cette dernière possibilité qui est utilisée dans notre cas ; ce filtre de masse constitue le premier quadripôle.

L'ion de masse recherchée passe ensuite dans la cellule de collision, qui contient un gaz de collision, ici de l'azote très pur. Par son énergie de collision, l'azote fragmente l'ion sélectionné par le premier quadripôle (qualifié plus loin d'ion parent) en fragments appelés ions fils ou ions fragments. La fragmentation obéit à deux règles : la proportion d'ions fils par rapport aux ions parents est constante, et pour un analyte donné, la masse des ions fils est aussi constante. Cette masse des ions fils est déterminée par le deuxième quadripôle, qui réalise un scan des ions fils. La masse et la quantité des ions fils sont ainsi déterminées. Pour notre analyse des données, on suit les deux ions fils majoritaires. On va donc étudier deux transitions : une transition consiste à isoler un ion parent avec le premier quadripôle, à suivre un ion fils et à étudier son signal.



*Fig. 13: Schéma des étapes en spectrométrie de masse*

Finalement, les critères d'identification d'une molécule en LC-MS/MS sont les suivants : son temps de rétention, la masse de l'ion parent, la masse de chacun des deux ions fils que l'on suit, et la proportion des deux ions fils. Chaque analyse dure vingt deux minutes.

### **c) Réglages et analyse des données à l'aide du logiciel**

Préalablement à toute analyse, l'opérateur programme les temps de rétention des molécules d'intérêt, la masse de l'ion parent recherché, la masse des deux ions fils, et l'énergie de collision. Tous ces paramètres spécifiques de l'analyte ont été déterminés par l'opérateur lors du développement analytique. Il remplit également la « worklist », avec le nom des échantillons, leur place sur l'échantillonneur et le dossier informatique vers lequel les résultats de chaque échantillon doivent être envoyés.

Le logiciel affiche les chromatogrammes, avec deux pics pour chaque molécule puisque l'on s'intéresse à deux ions fils par échantillon et donc à deux transitions. Le chromatogramme permet la détermination des concentrations via la courbe de calibration, et le fait d'imposer les masses des ions parents et fils, ainsi que la proportion des ions fils augmente la précision dans la détermination des espèces identifiées sur le chromatogramme par rapport à une simple chromatographie non couplée à la spectrométrie de masse où seul le temps de rétention permet d'identifier les molécules.

### ***E. Méthode d'évaluation de la résistance***

La mutation que l'on cherche à repérer est la mutation Y139F, la plus fréquente en France. Une PCR quantitative est mise en œuvre [14] ; les amorces sont spécifiques de la séquence mutée. Les nombres de cycles d'amplification obtenus pour chaque échantillon sont spécifiques du statut allélique de l'échantillon : homozygote sauvage noté S pour sensible, homozygote muté noté R pour résistant ou hétérozygote noté I pour intermédiaire.

### ***F. Evaluation du statut génétique d'une population***

Dans notre étude, afin de valider l'hypothèse d'un éventuel stockage d'appâts par les rats, il nous faut prouver que les rats piégés à long terme sont d'une population distincte de la population initiale. Jean François Cosson de l'INRA de Montpellier a réalisé ce travail. Il utilise 13 marqueurs microsatellites : plus la parenté entre individus est proche, plus les

microsatellites sont semblables dans leur taille. Une fois les résultats analysés, les individus sont classés en groupes familiaux, ce qui permet d'évaluer les liens entre individus.

## ***G. Analyse statistique des résultats***

Différents tests statistiques sont utilisés, ils sont effectués avec le logiciel R via le site de bio statistiques de l'université Jussieu [46]. Afin de montrer si l'augmentation de fréquence de présence de l'allèle de résistance observée est significative ou non, on choisit un test du  $\chi^2$  d'ajustement, que l'on pratique sur les différentes périodes de piégeages effectués. On prend pour ce test la fréquence de présence de l'allèle de résistance au point 0 comme situation de référence pour le site étudié. Une correction de Yates est effectuée dès que les effectifs calculés sont inférieurs à la valeur de 5.

On travaille de façon générale avec des tests non paramétriques, car les distributions des échantillons obtenus ne sont pas normales dans les conditions de terrain. C'est également la raison pour laquelle les différents graphes sont établis à partir de médianes de concentrations et non de moyennes. Cette distribution non normale est vérifiée plus loin, pour chacun des sites.

Pour comparer les valeurs de concentrations de chacun des AVK aux différentes étapes de piégeages, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis est utilisé.

Enfin, le piégeage de rats dont les foies contiennent de fortes quantités d'AVK sans pour autant montrer de signe d'intoxication aux anticoagulants nous amène à réaliser un test du  $\chi^2$  d'indépendance, afin d'évaluer une possible relation entre la possession d'un allèle de résistance et le fait de ne pas présenter de signes cliniques malgré d'importantes concentrations d'anticoagulants dans le foie de ces rats.

### **III. RESULTATS OBTENUS ET CONSEQUENCES**

#### ***A. Evaluation initiale du site de Marcy et choix du brodifacoum***

On piège 28 rats lors du point zéro. Quasiment tous les foies de rats contiennent de la bromadiolone, parfois à forte dose (rat Mar 9 : 9544,8 ng/g, voir tab.III ci-après), ce qui est compatible avec les précédents traitements effectués par les éleveurs. On retrouve également du difénacoum, et très peu de brodifacoum (en moyenne 2,4 ng/g et au maximum 23 ng/g). Les tests de résistance effectués sur ces 28 rats montrent une fréquence allélique de résistance de 77%. Ceci nous conduit à choisir un anticoagulant de dernière génération, afin de passer outre ces résistances. On choisit le brodifacoum, puisqu'il est très faiblement présent. De plus, il nous semble intéressant d'étudier l'impact de traitements avec des molécules différentes mais d'efficacité comparable sur les deux sites.

Tab.III : Résultats du point 0 (T0) à Marcy, concentrations en ng/g. BROM=bromadiolone, BRDF=brodifacoum, DFC=difénacoum, DFTL=diféthialone.

<b>Identification</b>	<b>Période</b>	<b>BROM</b>	<b>BRDF</b>	<b>DFC</b>	<b>DFTL</b>
MAR001	T0	17,3	0,0	0,5	0,0
MAR002	T0	9118,8	15,4	31,3	0,0
MAR003	T0	8,0	0,0	0,0	0,0
MAR004	T0	95,2	0,0	0,0	0,0
MAR005	T0	1989,2	0,0	1,9	0,0
MAR006	T0	11,5	0,0	0,0	0,0
MAR007	T0	56,7	0,0	0,0	0,0
MAR008	T0	20,2	0,0	0,0	0,0
MAR009	T0	9544,8	23,0	26,2	0,0
MAR010	T0	781,9	0,0	0,0	0,0
MAR011	T0	4919,4	1,6	7,0	0,0
MAR012	T0	6387,9	2,2	71,4	0,0
MAR013	T0	1683,7	0,0	7,9	0,0
MAR014	T0	580,4	0,0	4,4	0,0
MAR015	T0	3626,9	2,6	5,8	0,0
MAR016	T0	97,6	15,9	1788,9	0,0
MAR017	T0	5,2	0,0	0,0	0,0
MAR018	T0	106,0	0,0	115,6	6,0
MAR019	T0	554,3	0,0	106,0	0,0
MAR020	T0	2023,0	6,1	15,1	6,3
MAR021	T0	238,5	0,0	2,3	0,0
MAR022	T0	47,5	0,0	0,0	0,0
MAR023	T0	0,0	0,0	0,0	0,0
MAR024	T0	6,3	0,0	0,0	0,0
MAR025	T0	3,5	0,0	0,0	0,0
MAR026	T0	3,1	0,0	0,0	0,0
MAR027	T0	9,7	0,0	0,0	0,0
MAR028	T0	2,0	0,0	0,0	0,0

**B. Efficacité des piégeages à chaque étape sur les deux sites**

**1. Nombre de rats obtenus à chaque étape**

Tab.IV : Etapes de l'essai au poulailler

Période	Opération effectuée	Nombre de rats obtenus
Octobre 2010 à février 2011	Point « 0 » initial	10
<b>1<sup>er</sup> traitement diféthialone</b>		
Octobre 2012	Piégeage immédiatement post 1 <sup>er</sup> traitement à la diféthialone	118
Avril 2012	Piégeage 6 mois post 1 <sup>er</sup> traitement	37
Juin 2012	Evaluation population + point « 0 », 8 mois post 1 <sup>er</sup> traitement	14
<b>2<sup>ème</sup> traitement diféthialone</b>		
Juillet 2012	Piégeage immédiatement après le 2 <sup>ème</sup> traitement diféthialone	20
Octobre à décembre 2012	Evaluation population + piégeage 3-5 mois post 2 <sup>ème</sup> traitement	17

Tab.V : Etapes de l'essai à Marcy

Période	Opération effectuée	Nombre de rats obtenus
Mars 2012	Point « 0 »	28
<b>Traitement au brodifacoum</b>		
Avril 2012	Piégeage en post traitement immédiat au brodifacoum	32
Octobre à décembre 2012	Piégeage 6-8 mois post traitement	13

## 2. Résultats de l'évaluation des populations au poulailler

Voici ci-dessous les résultats de l'évaluation de la population en juin 2012 au poulailler, par mesure de la consommation journalière.

Tab.VI : Evaluation de la population au poulailler, juin 2012. Quantités en grammes.

P=Poulailler. Voir annexe 1 pour la localisation des plateaux dans P1

	P3 fond	P3 entrée	P2	<b>P1 entrée droite</b>	<b>P1 paille</b>	<b>P1 annexe fond droite</b>	<b>P1 annexe fond gauche</b>	<b>P1 annexe latérale</b>
J1 : quantité déposée (g)	250	250	200	800	1000	500	1000	800
J2 : consommation	20	0	20	240	380	370	230	70
J3 : consommation	0	0	40	440	350	400	180	80
J4 : consommation	0	0	45	480	370	500 : limite de consommation	165	125
J5 : consommation	0	0	45	480	370	500 : limite de consommation	165	125
<b>Population estimée</b>	<b>ε voire aucun</b>	<b>ε voire aucun</b>	<b>2 rats</b>	<b>19 rats</b>	<b>15 rats</b>	<b>&gt;20 rats</b>	<b>7 rats</b>	<b>5 rats</b>

On voit d'après les résultats ci-dessus que le poulailler 1 est le principal refuge des rats (colonnes en gras dans le tableau) : l'étude est uniquement réalisée dans ce bâtiment. On obtient un total indicatif de 66 rats adultes qui ont consommé le blé dans le premier bâtiment, 82 rats si l'on considère des jeunes (en prenant une moyenne de 20g/rat).

Cette évaluation de la population initiale n'a pas été faite sur le site de Marcy, d'une part car nous ne savons pas où placer les plateaux de façon stratégique, compte tenu de la grande surface du site. De plus, les plateaux avec le blé auraient été en extérieur en février, date du début de l'étude à Marcy, d'où une difficulté pratique en raison des intempéries.



Voici ci-dessous les résultats de l'évaluation de la population de rats au poulailler 4 mois après traitement, avant les piégeages dits « long terme ». Ces mesures ne portent que sur le poulailler P1.

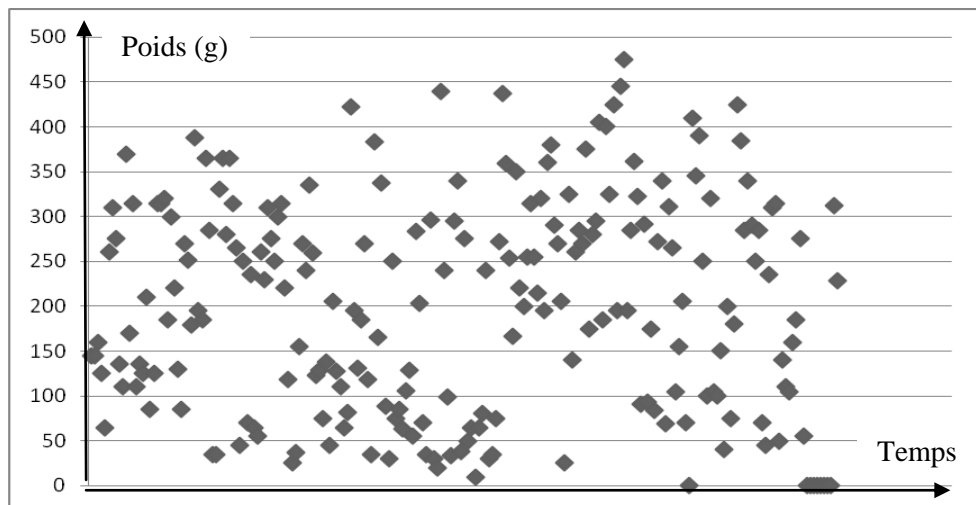
Tab.VII : Evaluation de la population au poulailler 4 mois post-traitement. Quantités en grammes, 6 plateaux sont utilisés

								Total consommé	Estimation du nombre de rats/ jour
<b>J0</b>	Mangeoire pleine	200	200	200	200	200	200		
<b>J1</b>	Après consommation	200	200	200	200	200	180	20	<b>1</b>
	Mangeoire pleine	200	200	200	200	200	200		
<b>J2</b>	Après consommation	200	200	200	150	200	200	50	<b>2</b>
	Mangeoire pleine	200	200	200	200	200	100		
<b>J4</b>	Après consommation	200	200	200	160	200	100	40	<b>2</b>
	Mangeoire pleine	200	200	200	200	200	200		
<b>J10</b>	Après consommation	200	50	80	100	0	0	770	<b>5</b>
	Mangeoire pleine	200	200	200	200	0	200		
<b>J12</b>	Après consommation	100	120	0	100	0	0	680	<b>14</b>

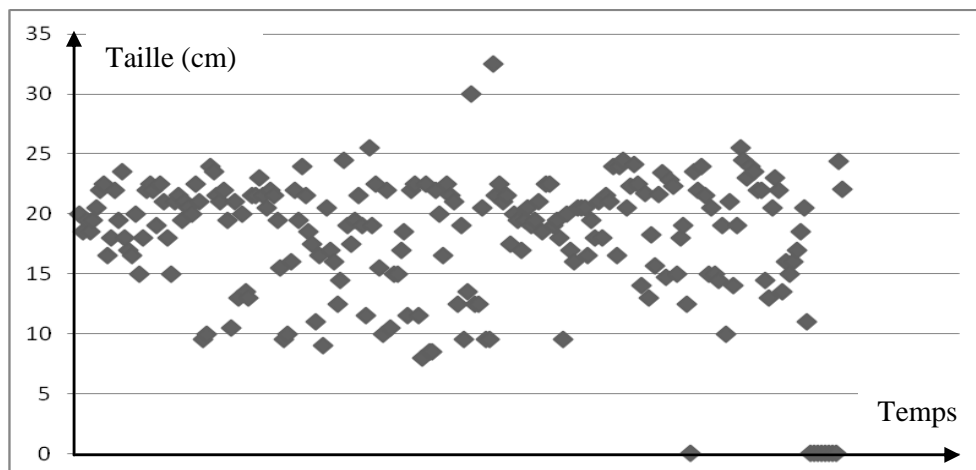
## C. *Echantillonnage*

### 1. **Au poulailler**

On obtient sur la totalité des piégeages, d'octobre 2011 à décembre 2012, 106 mâles et 110 femelles. Le sex-ratio des piégeages montre une population comparable à une population classique de rats.



*Fig. 14 : Répartition des poids (g) des rats piégés*



*Fig. 15 : Répartition des tailles (cm) des rats piégés*

Les rats piégés sont de tailles (de 8 à 32,5 cm) et de poids (de 9 à 475g) très divers. Cette grande dispersion des individus montre un échantillon plutôt fidèle d'une population de

rats, avec des individus jeunes, juvéniles et adultes (cf. annexes 2 et 3 pour les bases de données générales des deux sites étudiés). On ne note pas de différence notable entre les populations piégées au début et à la fin de l'essai.

Ci-dessous sont représentées les relations entre la taille et le poids de chacun des rats piégés aux différentes étapes de l'essai terrain. On remarque que les pentes des droites de tendances sont assez similaires, de même que les ordonnées à l'origine. Nous confirmerons un peu plus loin l'aspect similaire des populations piégées par un test de Kruskal Wallis, expliqué ci-après.

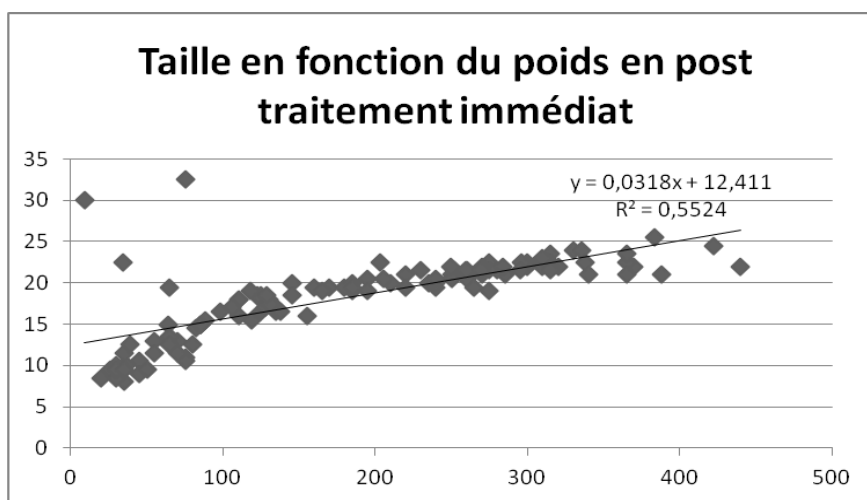


Fig.16 : Taille (cm) en fonction du poids (g) des rats piégés juste après le 1<sup>er</sup> traitement

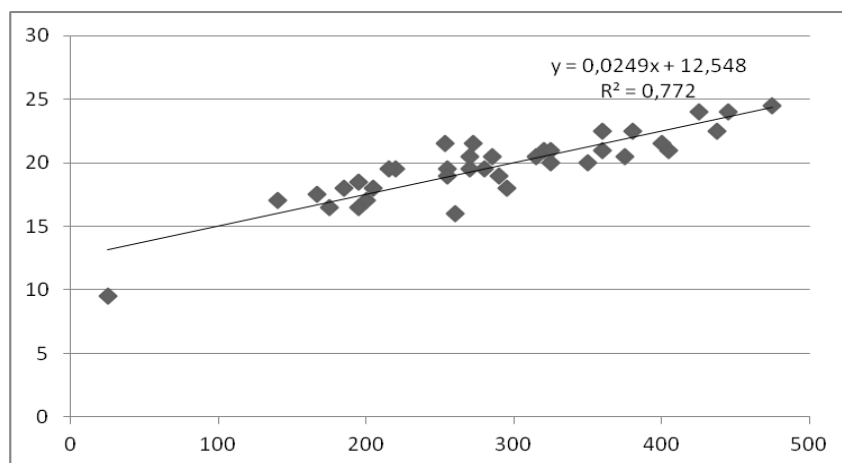


Fig.17 : Taille en fonction du poids des rats piégés 6 mois post 1<sup>er</sup> traitement

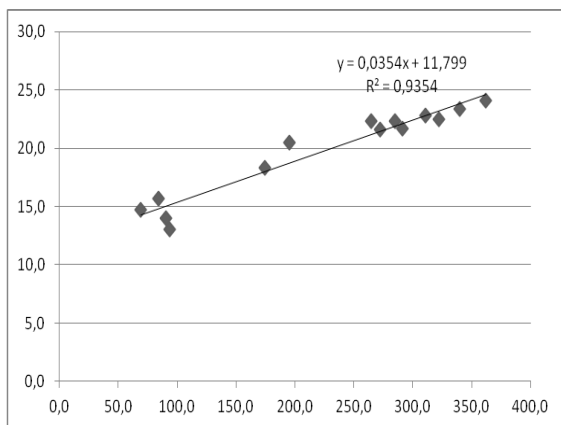


Fig.18 : Taille en fonction du poids 8 mois post 1<sup>er</sup> traitement

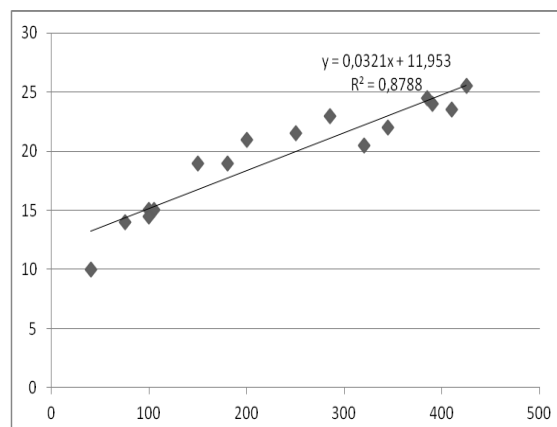


Fig.19 : Taille en fonction du poids juste après le 2<sup>ème</sup> traitement

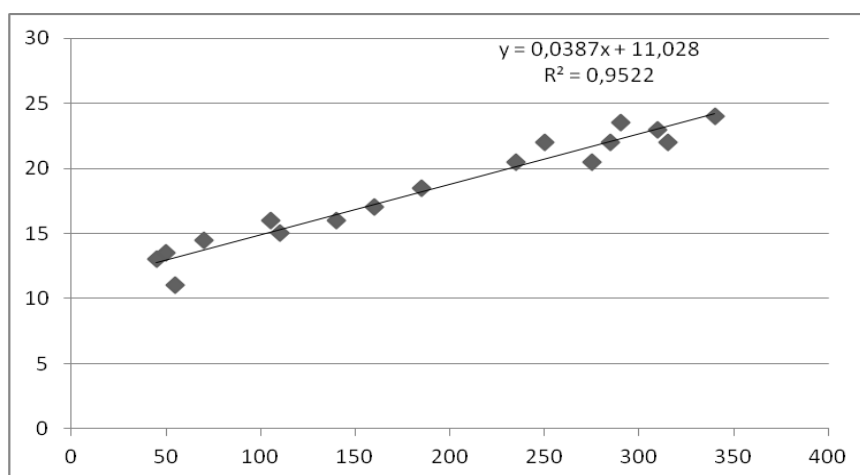


Fig.20 : Taille en fonction du poids des rats piégés 3-5 mois post 2<sup>ème</sup> traitement

La réalisation d'un test non paramétrique de Kruskal Wallis sur les différentes étapes du test, avec la variable quantitative taille/masse et en distinguant deux sous-groupes, les adultes et les jeunes (très jeunes et juvéniles), montre des échantillons de populations semblables quelque soient les étapes du test ( $p=0,84$ ).

## 2. A Marcy

On obtient par piégeages 37 mâles et 36 femelles. Là encore, le caractère représentatif des piégeages est mis en évidence par un sex-ratio respecté, et une répartition hétérogène des poids et des tailles des rats piégés, comme illustré ci-dessous. Les graphes aux différentes étapes du test montrent, comme au poulailler, une distribution semblable aux trois étapes de l'essai.

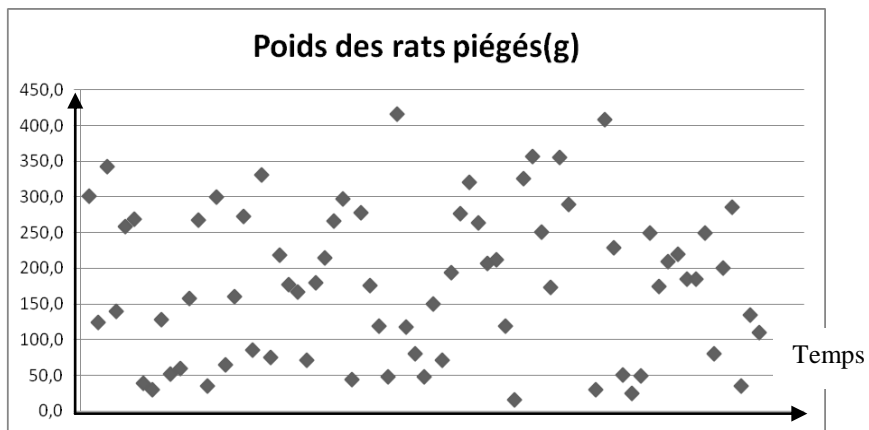


Fig.21 : Répartition des poids (g) des rats piégés tout au long de l'essai

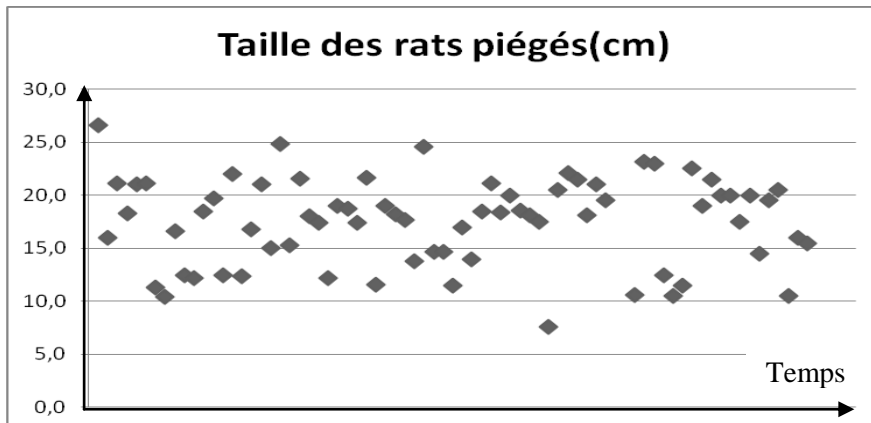


Fig.22 : Répartition des tailles des rats piégés sur l'essai

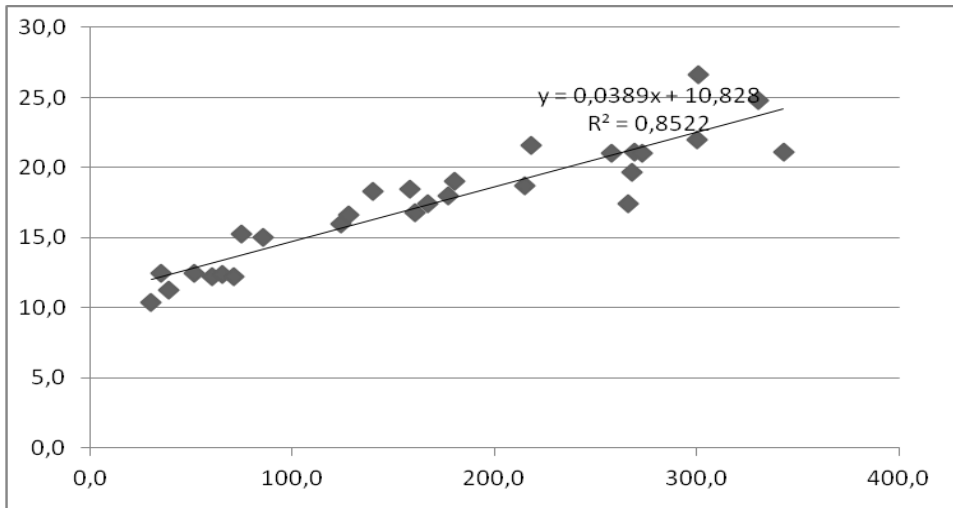


Fig.23 : Relation taille/poids au point 0

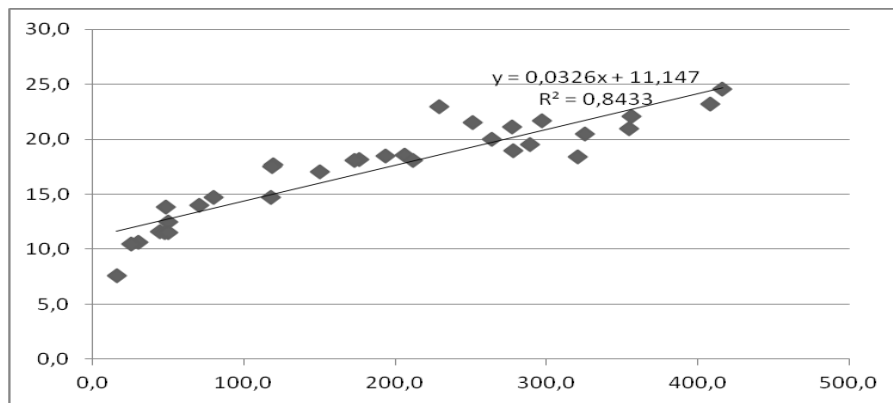


Fig.24 : Relation taille/poids en post-traitement immédiat

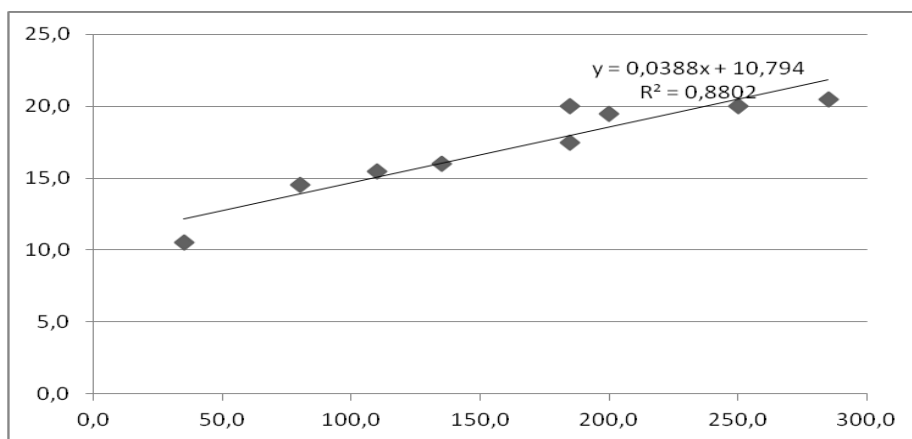


Fig.25 : Relation taille/poids 6 à 8 mois après traitement

Nous obtenons par test de Kruskal Wallis des résultats semblables à ceux du poulailler, avec  $p=0,87$ .

### 3. Bilan d'échantillonnage sur les deux sites

Comme nous comparons par la suite nos résultats sur les deux sites, nous avons vérifié que les populations de rats piégés sont effectivement similaires sur ces deux sites, tant quant à la répartition des rats entre classes d'âge qu'en ce qui concerne les poids des rats de ces différentes classes d'âge.

Tab. VIII : Répartition des différentes classes d'âge sur les deux sites

	<b>Poulailler</b>	<b>Marcy</b>
<b>Nombre d'adultes</b>	138	36
<b>Nombre de juvéniles</b>	40	17
<b>Nombre de bébés</b>	38	20

Un test de Wilcoxon Mann Whitney de comparaison de fréquences ne montre pas de différence significative dans la distribution des classes d'âge entre les deux sites ( $p=0,1$ ).

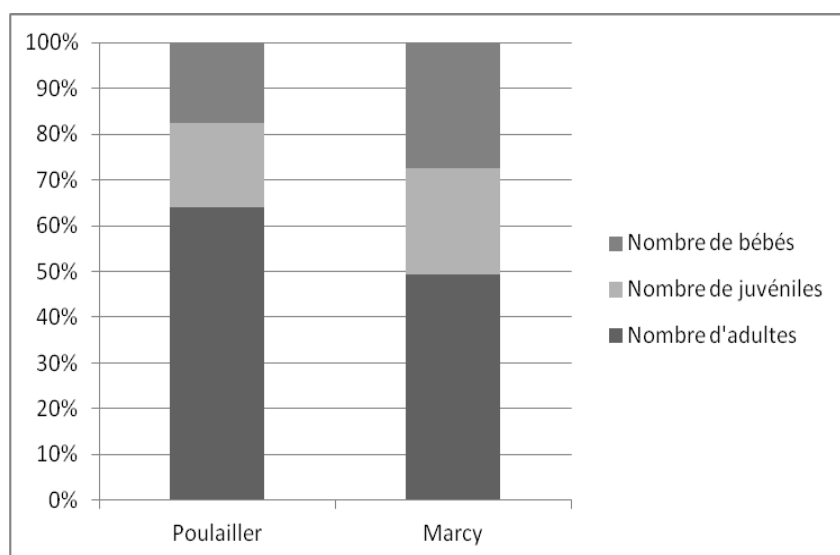


Fig. 26 : Part de chacune des classes d'âge sur les deux sites

Tab. IX : Médianes des masses (g) des rats selon les sites et les classes d'âge

	<b>Poulailler</b>	<b>Marcy</b>
<b>Médianes masses adultes (g)</b>	281	268
<b>Médianes masses juvéniles (g)</b>	122	112
<b>Médianes masses bébés (g)</b>	53	50

A nouveau, le test de Wilcoxon Mann et Whitney montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les poids des différentes classes d'âge selon les sites concernés ( $p=0,7$ ). Nous pourrions donc par la suite comparer nos deux sites, puisque les populations de rats y sont du même type.

#### ***D. Résultats obtenus par les microsatellites***

Les résultats montrent que les profils génétiques des rats piégés avant et après traitement au poulailler sont complètement différents : les rats piégés en post traitement proviennent donc bien d'une nouvelle population qui a colonisé le site laissé vacant. Tant qu'une population de rats occupe un lieu donné, un rat provenant d'une autre population qui arrive dans ce lieu est rejeté et ne peut pas se reproduire. Dès lors que l'ancienne population est éliminée, la reproduction par les rats nouvellement arrivés devient possible, ce qui conduit rapidement à l'établissement d'une nouvelle population [8].

#### ***E. Evaluation de la bioaccumulation***

Suite aux dosages effectués, il nous est possible d'évaluer la bioaccumulation des AVK chez le rat brun. Cette notion est définie comme « l'accumulation nette d'un contaminant dans ou sur un organisme, venant de toutes les sources dont l'eau, l'air et l'alimentation » [24]. Dans notre essai, on évalue plutôt l'accumulation des AVK dans une population et non chez



un individu, puisque les rats piégés aux différentes étapes du test sont extraits de façon définitive de cette population. On cherche donc à mesurer les évolutions des concentrations des différentes molécules selon les étapes des deux essais.

A noter que l'on ne tient compte que des concentrations en bromadiolone, en difénacoum, en brodifacoum et en diféthialone, car les dosages du flocoumafène, du coumatétralyl et de la chlorophacinone ont montré des valeurs nulles pour la quasi-totalité des rats testés.

## 1. Evolution des concentrations en AVK au poulailler

### a) Choix de la méthode d'exploitation des données

Préalablement à toute l'analyse des résultats de dosages, il est nécessaire de déterminer les paramètres qui pourront résumer les données afin de représenter ces dernières. Ci-dessous dans le tableau X, différents paramètres établis à partir des concentrations en diféthialone – moyenne, médiane, écart-type, minimum et maximum - sont donnés pour les différentes étapes de l'essai. On voit que les moyennes sont très éloignées des médianes, avec des écarts-types très importants : on représente donc les données par les médianes des concentrations.

Tab. X: Réduction des concentrations (en ng/g) en diféthialone

	Avant tout traitement	Immédiatement post 1 <sup>er</sup> traitement	6 mois post 1 <sup>er</sup> traitement	8 mois post 1 <sup>er</sup> traitement	Juste après 2 <sup>ème</sup> traitement	3 à 5 mois après 2 <sup>ème</sup> traitement
<b>Min</b>	6,5	0	7,9	9,1	79,7	30,3
<b>Max</b>	1209,7	114623,2	4262,6	2509,3	69597,8	1147,6
<b>Moyennes</b>	<b>192,2</b>	<b>12126,5</b>	<b>540,6</b>	<b>403,5</b>	<b>18390</b>	<b>261,4</b>
<b>Médianes</b>	<b>21,6</b>	<b>851,5</b>	<b>93,6</b>	<b>53,6</b>	<b>14593,9</b>	<b>78,4</b>
<b>Écarts types</b>	<i>373,1</i>	<i>19489</i>	<i>911,9</i>	<i>684,1</i>	<i>15333,6</i>	<i>336,3</i>

## b) Analyse des résultats de concentrations obtenus

Le tableau ci-après donne les valeurs des médianes de concentrations pour les quatre molécules étudiées, pour chacune des étapes de l'essai.

Tab. XI : Médianes des concentrations en AVK (ng/g) selon les étapes de l'essai

Molécule	Avant tout traitement	Immédiatement post 1 <sup>er</sup> traitement	6 mois après 1 <sup>er</sup> traitement	8 mois après 1 <sup>er</sup> traitement	Immédiatement post 2 <sup>ème</sup> traitement	3 à 5 mois post 2 <sup>ème</sup> traitement
Bromadiolone	159,5	43,4	14,6	24,9	32,1	14,4
Difénacoum	1	5,1	444,9	10,7	32,6	0
Brodifacoum	0,7	0	2,1	0	12,6	0
<b>Diféthialone</b> <i>(en italique : proportion de rats dont le foie contient des résidus de diféthialone)</i>	<b>21,6</b> <i>(100%)</i>	<b>851,5</b> <i>(97%)</i>	<b>93,6</b> <i>(100%)</i>	<b>53,6</b> <i>(100%)</i>	<b>14593,9</b> <i>(100%)</i>	<b>78,4</b> <i>(100%)</i>

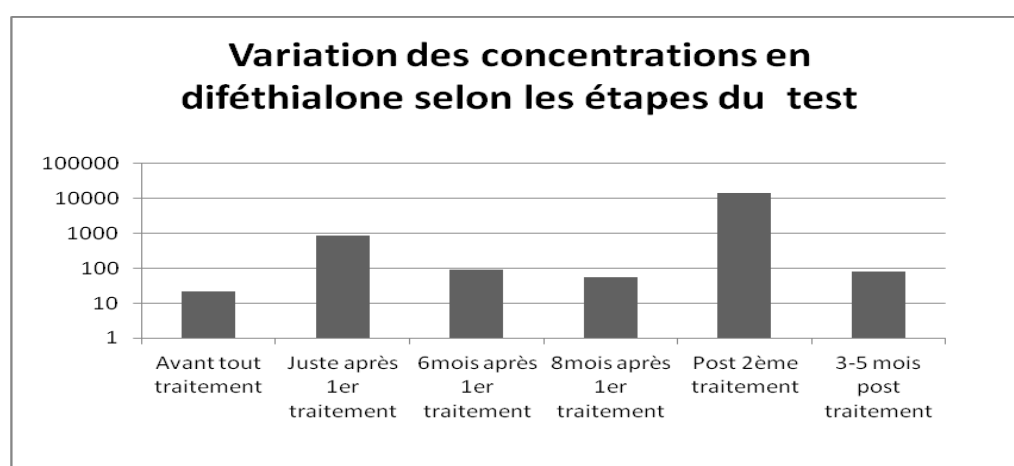


Fig.27 : Variation des médianes des concentrations en diféthialone selon les étapes de l'essai. Echelle logarithmique

Avant le tout premier traitement, de la diféthialone était déjà présente dans les foies de tous les rats prélevés, mais en très petites quantités (médiane=21,6 ng/g) : le site est déjà contaminé à bas bruit. Après chacun des traitements, les concentrations en diféthialone augmentent, ce qui est logique puisque c'est cette molécule que l'on utilise pour traiter le site. Dans les jours qui suivent les deux traitements, tous les rats sont éliminés car il n'y a pas de résistance décrite à la diféthialone. Cependant, on retrouve de la diféthialone dans les foies de rats piégés 6 et 8 mois après le premier traitement (médiane de 93,6 ng/g six mois post traitement et 53,6 ng/g huit mois post traitement). Or, 50% des rats ont des concentrations en diféthialone supérieures à cette valeur puisque l'on considère les médianes des concentrations. Les quantités retrouvées dans les foies de rats à long terme ne sont donc pas négligeables et très supérieures à celles présentes initialement.

Comme le site n'a été traité à la diféthialone que par l'école, on propose deux hypothèses quant à l'origine de cette diféthialone.

- Soit les rats traités ont fait des stocks qui ont été consommés par la population suivante, ce qui validerait notre hypothèse.
- Soit il y a eu introduction de nouvelles populations venant d'un autre endroit traité à la diféthialone, qui serait proche du poulailler.

Nous verrons dans la partie concernant le site de Marcy que les résultats sont les mêmes avec le brodifacoum utilisé sur cet autre site ; or, une telle similitude sur les deux sites est peu probable, et nous retenons l'hypothèse que les rats traités ont stocké des appâts, consommés par la suite en de faibles quantités par la nouvelle population qui colonise la niche écologique laissée vacante.

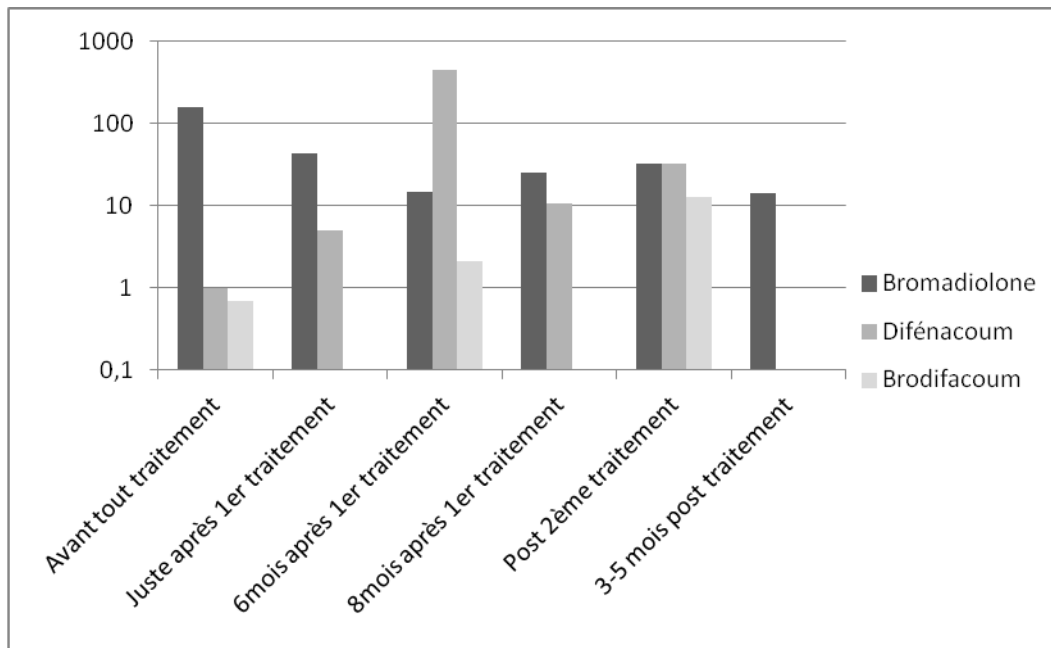


Fig. 28 : Variations des médianes de concentrations en bromadiolone, en difénacoum et en brodifacoum. Echelle logarithmique

Avant le premier traitement, les quatre molécules étudiées sont présentes, avec essentiellement de la bromadiolone. Les concentrations diminuent suite au traitement, sauf pour le difénacoum qui est très présent à 6 mois post 1<sup>er</sup> traitement (médiane=444,9 ng/g). Les rats piégés sont tous vivants et aucune hémorragie n'est notée à l'autopsie, constat étonnant puisque l'on considère généralement que 100 ng/g est le seuil d'apparition des signes cliniques. Ceci est à mettre en relation avec un traitement au difénacoum effectué sur le site par les propriétaires, et avec un probable gène de résistance chez ces rats : le test d'évaluation de la résistance n'a malheureusement pas été fait sur ces rats là, donc la conclusion reste incertaine. Nous verrons cependant plus loin que la possession de l'allèle de résistance ne suffit pas à expliquer l'absence de signes cliniques chez ces rats.

Les figures 27 et 28 montrent donc une variation des concentrations en bromadiolone, difénacoum, brodifacoum et diféthialone à toutes les étapes de l'essai terrain. Si l'on explique facilement les teneurs en diféthialone ou en difénacoum par des traitements effectués, les variations de concentrations en bromadiolone et brodifacoum sont moins compréhensibles. On peut suspecter que les éleveurs ont traité sans en informer l'équipe, avec de la bromadiolone entre 0 et 6 mois post premier traitement, et/ou avec du brodifacoum juste avant le deuxième traitement à la diféthialone. La deuxième hypothèse consiste en une

contamination éventuelle des appâts par d'autres molécules que la diféthialone, la méthode de dosage étant très sensible.

On note cependant, à l'exception notable du difénacoum, que les valeurs mesurées sont faibles au regard des valeurs toxiques (> 100 ng/g dans le foie) et compatibles sans doute avec la survie de rats résistants. Elles signifient qu'il y a usage de multiples AVK localement, le poulailler étant situé en bordure d'une petite ville, on peut supposer que des traitements raticides sont effectués aussi autour et que les rongeurs ont pu aussi aller chercher des aliments (ou des raticides) à proximité du poulailler.

Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis est réalisé pour les quatre molécules dosées, afin de montrer une éventuelle homogénéité des valeurs de concentrations de chacun des anticoagulants aux différentes étapes de l'essai. Le tableau XII résume les résultats de ces tests.

Tab. XII : Résultats du test de Kruskal-Wallis au poulailler

<b>AVK testé</b>	<b>Qobs</b>	<b>p-value</b>
Bromadiolone	24,06	0,00021
Brodifacoum	65,82	$7,58.10^{-13}$
Difénacoum	75,14	$8,71.10^{-15}$
<b>Diféthialone</b>	<b>40,82</b>	<b><math>1,02.10^{-7}</math></b>

Toutes les p-values sont inférieures à la valeur de 0,05 : pour chaque molécule, les différences de moyennes de concentrations selon les étapes du test sont significatives. La situation au poulailler en termes de concentrations d'AVK est donc fluctuante ; les quatre molécules étudiées sont présentes en concentrations très variables selon les périodes.

## 2. Evaluation des concentrations en AVK à Marcy

### a) Exploitation des enseignements du point « 0 »

L'analyse des données obtenues au point 0, résumées dans le tableau XIII, montre tout d'abord que la bromadiolone est retrouvée en grandes quantités dans les foies des rats (médiane= 96,4 ng/g et moyenne= 1497,8 ng/g), comme expliqué auparavant. Le difénacoum est faiblement présent, la diféthialone ne figure pas sur ce tableau car les quantités mesurées sont extrêmement faibles. Pour ce qui est du brodifacoum, il est très peu présent et il s'agit d'une molécule de dernière génération ; elle est choisie pour ces raisons pour traiter le site.

Comme au poulailler, on observe une grande disparité entre les moyennes et les médianes, et des écarts-types forts ; le modèle non paramétrique est à nouveau privilégié pour l'analyse statistique des résultats.

Tab.XIII : Réduction des données en ng/g au point « 0 »

	<b>Brodifacoum</b>	<b>Bromadiolone</b>	<b>Difénacoum</b>
<b>Min</b>	0	0	0
<b>Max</b>	23	9544,8	1788,9
<b>Moyennes</b>	<b>2,4</b>	<b>1497,8</b>	<b>78</b>
<b>Médianes</b>	<b>0</b>	<b>96,4</b>	<b>0,2</b>
<b>Ecart types</b>	5,8	2734,1	336,7

**b) Exploitation des résultats de concentrations obtenues**

Tab.XIV : Médianes des concentrations (ng/g) en AVK aux différentes étapes de l'essai

	Point 0	Immédiatement post traitement au brodifacoum	6-8 mois post traitement
Bromadiolone	96,4	80	584,9
Difénacoum	0,2	7,4	11
<b>Brodifacoum</b> ( <i>en italique : proportion de rats dont le foie contient des résidus de brodifacoum</i> )	<b>0 (25%)</b>	<b>1692,9 (97%)</b>	<b>52,9 (100%)</b>
Diféthialone	0	0	0

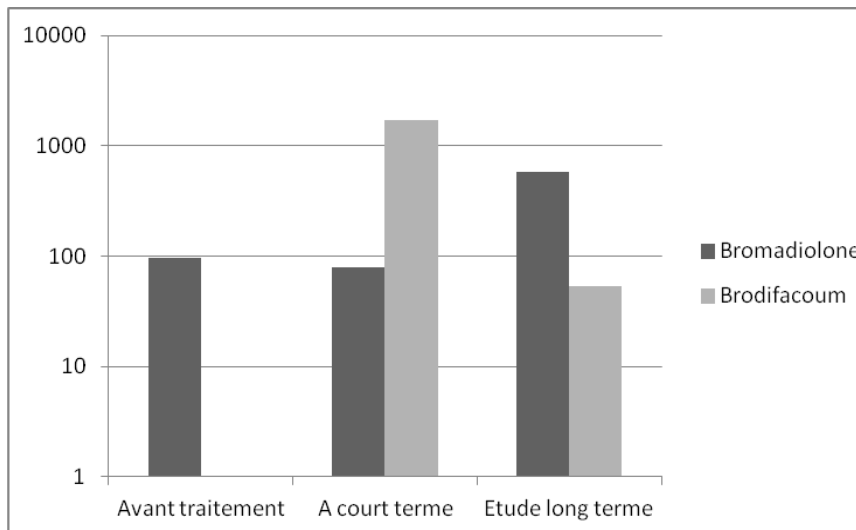


Fig.29 : Variations des concentrations en bromadiolone et brodifacoum aux trois étapes de l'essai

La figure 29 montre un fort taux de bromadiolone avant traitement (médiane=96,4 ng/g). La concentration de cet AVK reste élevée en post-traitement immédiat, avec une médiane de

concentration de 80 ng/g, et augmente à long terme. On observe dans le tableau XIV une augmentation des concentrations en difénacoum, mais celles-ci restent très faibles. La diféthialone n'est quasiment pas présente sur ce site. On peut donc expliquer la persistance de la bromadiolone intrahépatique après le traitement au brodifacoum par la colonisation du site par une nouvelle population, qui elle-même avait été traitée à la bromadiolone si elle est résistante, ou dont les ancêtres avaient été traités si cette nouvelle population a consommé les appâts qu'ils avaient stockés, tout en étant elle-même résistante.

Nous venons donc de visualiser sur le graphique (fig.29) que les concentrations en AVK, notamment en bromadiolone et bien sûr en brodifacoum, fluctuent. On réalise comme précédemment un test de Kruskal-Wallis pour comparer de façon globale les moyennes des concentrations obtenues. Trois groupes sont comparés pour chaque molécule, ils correspondent aux trois étapes du test. On a 28 rats dans le premier groupe, 32 dans le deuxième et 13 dans le dernier. Le tableau ci-dessous donne les résultats du test.

Tab. XV : Résultats du test de Kruskal-Wallis à Marcy

<b>AVK testé</b>	<b>Qobs</b>	<b>p-value</b>
Bromadiolone	4,01	0,14
Difénacoum	5,36	0,068
Diféthialone	1,41	0,49
<b>Brodifacoum</b>	<b>51,76</b>	<b>5,76.10<sup>-12</sup></b>

On obtient des p-values supérieures à 0,05 pour la diféthialone, le difénacoum et la bromadiolone : il n'y a donc pas de différence significative entre les valeurs de concentrations selon les stades de l'essai terrain, bien que l'on ait constaté une augmentation importante des concentrations en bromadiolone dans l'étude à long terme. En revanche et comme on l'attendait, la différence est significative pour ce qui est du brodifacoum, avec une très forte augmentation des concentrations suite au traitement appliqué.



### c) Validation de l'hypothèse de stockage d'appâts par les rats

La teneur médiane en brodifacoum reste non nulle 6 à 8 mois post traitement, comme on le voit sur la figure 29. Le tableau XVI étudie plus particulièrement les données relatives aux concentrations de cet AVK dans l'étude dite long terme, c'est-à-dire dans les 6 à 8 mois qui ont suivi le traitement.

Tab. XVI : Réduction des concentrations obtenues en brodifacoum à long terme, 6-8 mois post traitement

	<b>Concentrations en brodifacoum (ng/g)</b>
<b>Min</b>	4,3
<b>Max</b>	1535,1
<b>Moyenne</b>	260,9
<b>Médiane</b>	52,9

On constate que la médiane de concentration pour le brodifacoum reste de 52,9 ng/g, avec donc 50% des rats pour lesquels les concentrations hépatiques en molécules sont supérieures. La moyenne (260,9 ng/g) est supérieure au seuil d'apparition des signes cliniques. Ainsi, la persistance à long terme du brodifacoum nous conduit aux mêmes hypothèses qu'au poulailler: soit la population traitée a effectivement stocké des appâts, soit une nouvelle population elle-même traitée et résistante s'est installée. Cette seconde hypothèse est peu probable car le site de la ferme est très vaste, il comprend à la fois le bâtiment des vaches laitières, deux poulaillers, un clapier, le bâtiment des veaux et les bâtiments de stockage d'aliments. Or, les nouvelles populations de rongeurs qui s'installent viennent en général d'un site géographiquement proche du site traité, et aucun traitement au brodifacoum autre que notre traitement n'a été effectué à la ferme depuis le début de l'essai. De plus, il ne s'agit pas non plus d'une nouvelle population qui avait été traitée au brodifacoum antérieurement à notre arrivée, puisque les éleveurs utilisaient de la bromadiolone ou d'autres molécules anciennes, dont le brodifacoum ne fait pas partie.

### 3. Bilan général des résultats des deux sites

Les résultats obtenus sur les deux sites montrent des résultats similaires.

Effectivement, on continue à retrouver la molécule utilisée pour un traitement anticoagulant dans les foies de rats piégés, pendant au moins huit mois (durée maximale d'évaluation à Marcy et suite au premier traitement au poulailler). Après cette durée, on retrouve respectivement des médianes de concentrations de 53,6 ng/g et 52,9 ng/g au poulailler et à Marcy.

Ces résultats semblables en termes de persistance de la molécule utilisée pour le traitement renforcent l'hypothèse selon laquelle les rats traités enterrent et stockent des appâts, qui sont ensuite consommés par la nouvelle population qui s'installe. Les anticoagulants étant stables en l'absence de lumière, cette persistance dans les terriers est donc plausible.

Une étude effectuée dans le Jura sur des sites colonisés par les campagnols a montré le rôle capital du comportement de stockage qu'ont ces rongeurs dans la persistance des AVK placés lors d'un traitement anticoagulant [41]. Cet essai porte sur la bromadiolone, seul rodenticide utilisable chez le campagnol en France. L'importance de trois paramètres dans la persistance à long terme de la bromadiolone est évaluée : la composition du sol au lieu de pose de l'appât, les conditions climatiques et principalement la saison, et enfin le lieu de stockage de l'appât. Celui-ci consiste soit en galeries de 30m creusées artificiellement, soit en terriers confinés (15\*15\*15cm). Les résultats obtenus sont éloquentes : la demi-vie de la bromadiolone varie de 3 à 6,2 jours si l'appât traité est placé dans une galerie, tandis qu'elle oscille entre 24,6 et 42,7 jours lorsque l'appât est dans un terrier. L'AVK persiste donc bien plus longtemps dans les terriers. Cette différence est expliquée par un moindre lessivage de la bromadiolone par les précipitations dans les terriers, qui protègent mieux l'appât.

Le terrier est artificiel dans l'étude, mais montre que lorsqu'un rongeur stocke un appât dans une cavité protégée des agressions de l'environnement, la molécule anticoagulante persiste plus longtemps ; elle peut alors être éventuellement consommée par une nouvelle population.

## F. Evolution de la résistance

### 1. Au poulailler

On cherche à montrer une augmentation de la fréquence de présence de l'allèle de résistance, corrélée à l'utilisation d'anticoagulants.

Tab.XVII : Evaluation des génotypes des rats piégés au cours de l'étude au poulailler  
R= homozygote résistant, I=hétérozygote, S=homozygote sensible

Période de l'essai	Répartition des génotypes des rats piégés
Avant tout traitement	7R, 3I, 0S : 85% de fréquence de présence de l'allèle R
Immédiatement post 1 <sup>er</sup> traitement	Absence de données de résistance
8 mois post 1 <sup>er</sup> traitement	14R, 0I,0S
Immédiatement post 2 <sup>ème</sup> traitement	20R,0I,0S
3-5 mois post 2 <sup>ème</sup> traitement	17R,0I,0S

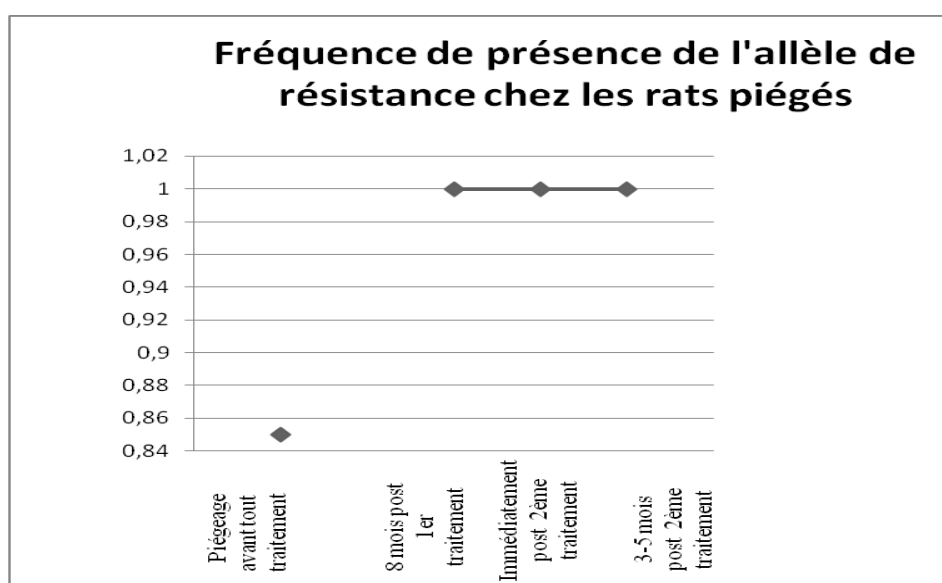


Fig. 30 : Evolution de la fréquence de présence de l'allèle de résistance chez les rats piégés selon les étapes de l'essai

La proportion de rats résistants aux anticoagulants augmente jusqu'à l'obtention d'une population entièrement résistante aux anticoagulants. On effectue un test du  $\chi^2$  d'ajustement, en prenant la situation à T0, avant tout traitement par l'équipe de recherche, comme situation ou loi de référence. Le tableau ci-dessous donne le détail du test.

Tab.XVIII : Test du  $\chi^2$  d'ajustement

	Nombre d'allèles R		Nombre d'allèles S	
<b>Avant tout traitement</b> <b>=référence du site</b>	17		3	
<b>8 mois post 1<sup>er</sup> traitement</b>	28	<u>23,8</u>	0	<u>4,2</u>

Les valeurs soulignées correspondent aux effectifs calculés. Suite à l'application de la correction de Yates, on obtient  $\chi^2$  corrigé = 3,834. Avec un degré de liberté et par lecture de la table unilatérale du  $\chi^2$  de Pearson, on a p-value > 0,05. On ne met donc pas en évidence de différence significative sur l'augmentation de la fréquence de présence de l'allèle de résistance. L'augmentation de la fréquence de présence de l'allèle de résistance suite au traitement anticoagulant est donc mesurée mais cette augmentation n'est pas significative.

## 2. A Marcy

On réalise le même travail qu'au poulailler. Voici ci-dessous les résultats de fréquence de présence de l'allèle de résistance aux trois périodes de l'essai terrain.

Tab. XIX : Fréquences de présence de l'allèle de résistance à Marcy

	Point 0	Immédiatement post traitement au brodifacoum	6-8 mois post traitement
<b>Fréquence de l'allèle de résistance</b>	77%	78%	67%, 83% sans rats du lieu « E »

Rapidement suite au traitement, cette fréquence est légèrement augmentée. Pour ce qui est de l'étude long terme, les rats « E » sont séparés. Ce site « E » correspond au clapier précédemment évoqué, sur lequel les piègeages ont été réalisés uniquement à long terme, lorsque les éleveurs nous ont signalé la présence de rats. Ce site « E » ne concerne que six rats.

Aucun appât n'a été placé sur ce site lors du traitement au brodifacoum. On y trouve, au moment du piégeage long terme, 50% d'allèles S et 50% d'allèles R. Or, lorsque l'on considère les rats piégés à long terme en excluant ces rats dits « E », on trouve une fréquence de présence de l'allèle de résistance de 83%. Ces rats du clapier ont donc une génétique différente, et également différente de celle des rats d'autres sites sur la ferme avant tout traitement. Cependant, ces différences génétiques basées sur des fréquences de présence d'allèles de résistance différentes sont à manier avec précautions : cette différence est établie sur un faible nombre de rats piégés en « E » : 6 rats.

Ainsi, si on exclut les rats « E », la fréquence continue d'augmenter sur l'étude à long terme. Afin de voir si cette augmentation est significative, on réalise comme précédemment un test du  $\chi^2$  d'ajustement. Les effectifs au point 0 sont pris comme effectifs théoriques pour le site. Le test est réalisé deux fois, à court et à long terme.

Tab.XX : Test du  $\chi^2$  pour l'étude à court terme

	Nombre d'allèles R	Nombre d'allèles S
<b>Avant traitement (théorie)</b>	43	13
<b>Juste après traitement, étude court terme</b>	39 <u>38,39</u>	11 <u>11,61</u>

On obtient comme critère du test  $\chi^2=0,041$ . Par table unilatérale du  $\chi^2$  de Pearson de degré de liberté=1,  $p>0,1$  donc l'augmentation de la fréquence de l'allèle de résistance en post traitement immédiat n'est pas significative.

Tab.XXI : Test du  $\chi^2$  pour l'étude à long terme

	Nombre d'allèles R	Nombre d'allèles S
<b>Avant traitement (théorie)</b>	43	13
<b>6-8 mois post traitement (long terme) sans rats « E »</b>	10 <u>9,2142</u>	2 <u>2,7857</u>

On applique ici la correction de Yates, ce qui donne  $\chi^2$  corrigé=0,0382. Donc  $p>0,1$  et la différence est également non significative pour l'étude à long terme.

### 3. Bilan général des résultats de résistance

Sur les deux sites, les fréquences de présence de l'allèle de résistance augmentent suite aux traitements, que ce soit avec de la diféthialone ou du brodifacoum. On envisage donc qu'un traitement anticoagulant avec une molécule de dernière génération entraîne une augmentation de la pression de résistance, avec sélection d'individus résistants. Cependant, le caractère significatif de cette augmentation n'a pas été montré lors de l'analyse séparée des deux sites; la forte pression de résistance avant tout traitement (85 et 77%) expliquant peut être cette difficulté. Une autre cause possible est le manque de puissance des tests, réalisés sur chacun des sites individuellement.

Compte tenu de la similitude des populations en termes démographiques et biométriques, il nous a paru logique de regrouper les rats des deux sites afin d'obtenir un effectif plus puissant, et en excluant toujours les rats « E » de Marcy : nous obtenons  $\chi^2=6,21$ , d'où  $p<0,05$  et une augmentation significative de la fréquence de résistance lors de l'étude à long terme, malgré l'utilisation de molécules récentes pour lesquelles il n'existe pas de résistance décrite *in vitro*. Voici ci-dessous les données utilisées pour ce test.

Tab.XXII : Test du  $\chi^2$  d'ajustement pour l'étude long terme sur les deux sites

	Nombre d'allèles R	Nombre d'allèles S
Avant traitement (théorie)	60	16
Etude long terme sans rats « E »	38 <u>31,56</u>	2 <u>8,42</u>

### 4. Etude de l'impact clinique de la résistance

Il apparaît dans les résultats de nombreux rats chez lesquels des concentrations bien supérieures au seuil d'apparition de signes cliniques de 100 ng/g sont mesurées, et qui pourtant ont été piégés vivants et dont l'autopsie n'a pas montré d'hémorragie. On souhaite alors voir si cette apparente résistance clinique peut être reliée à une résistance génétique, par présence d'un allèle de résistance.

On s'intéresse donc uniquement aux rats de statut génétique testé et dont les concentrations mesurées en AVK excèdent 100 ng/g. Le travail est réalisé uniquement sur le

site de Marcy, où les statuts génétiques des rats restent tout de même plus variés qu'au poulailler où tous les rats sont résistants à long terme.

Les critères de sélection des individus nous permettent d'isoler 28 rats.

Pour déterminer si l'apparition de signes cliniques d'intoxication aux anticoagulants est liée au statut génétique de l'animal chez des rats piégés avec une concentration élevée en brodifacoum, on effectue un test du  $\chi^2$  d'indépendance. Etant donné que les effectifs sont petits, comme le montre la table de contingence ci-après, un test exact de Fisher est préféré.

Tab.XXIII : Rats répondants aux critères de sélection pour la mise en relation de la clinique avec le statut génétique. Y=yes, présence d'hémorragie. N=no, absence d'hémorragie. En grisé : rats piégés en post-traitement immédiat.

Nom	Hémorragie	Etat	R/I/S	Brodifacoum (ng/g)
MAR031	Y	dead	R	3562,1
MAR032	Y	dead	R	1281,4
MAR033	Y	dead	I	3612,0
MAR034	Y	dead	S	991,6
MAR035	Y	dead	R	750,0
MAR036	Y	dead	R	243,1
MAR037	Y	dead	R	1018,3
MAR038	Y	dead	I	529,9
MAR039	Y	dead	I	2199,8
MAR040	Y	dead	I	1140,5
MAR041	Y	dead	R	3214,8
MAR042	Y	dead	R	2266,8
MAR043	Y	dead	R	4061,7
MAR044	Y	dead	R	2859,8
MAR045	Y	dead	R	2145,4

MAR046	Y	dead	R	1412,8
MAR047	Y	dead	I	1399,2
MAR048	N	dead	R	263,1
MAR049	Y	dead	R	2415,3
MAR050	Y	dead	I	2104,2
MAR051	Y	dead	S	157,8
MAR052	Y	dead	R	1194,4
MAR053	Y	dead	R	3082,8
MAR061	N	alive	R	335,3
MAR062	N	alive	I	616,1
MAR063	N	alive	R	285,4
MAR064	N	alive	I	408,6
MAR066	N	dead	R	121,3

Un rat est considéré comme présentant des signes cliniques d'intoxication aux AVK si des hémorragies ont été vues en autopsie.

Tab.XXIV : Table de contingence pour le test exact de Fisher

Statut génétique	Statut clinique		Total
	Présence de signes cliniques	Absence de signes cliniques	
<b>R</b>	14	4	18
<b>S</b>	2	0	2
<b>I</b>	6	2	8
<b>Total</b>	22	6	28

Le test donne une p-value de 1 ( $>0,05$ ). Donc l'hypothèse d'indépendance des caractères « présence de signes cliniques » et « statut génétique » chez des rats dont le foie contient plus de 100 ng/g de brodifacoum ne peut être rejetée.



Finalement, l'absence de signes cliniques malgré de fortes concentrations en AVK ne peut pas s'expliquer uniquement par la possession de l'allèle de résistance. On pourrait penser à l'impact de mutations du gène *vkor* autres qu'Y139F, seule mutation testée dans notre étude, ou encore à la mise en jeu de mécanismes de résistance via les cytochromes P450. Cependant, la mise en jeu de plusieurs mutations sur le gène *vkor* est peu probable de par la faible longueur de ce gène. Un manque de puissance du test pourrait aussi expliquer ce résultat, mais réaliser ce test au poulailler où tous les rats sont résistants à terme n'est pas intéressant : une étude ultérieure avec un échantillonnage plus grand de rats de statut génétique connu, si possible varié, et avec des concentrations hépatiques en AVK supérieures à 100 ng/g permettrait d'éclaircir ce point.

On peut aussi s'intéresser à une éventuelle relation entre le statut sensible ou résistant du rat et les concentrations moyennes en brodifacoum que l'on dose. On travaille sur les rats piégés à long terme, 6 à 8 mois après traitement, en regroupant les rats intermédiaires et résistants. Un test non paramétrique de comparaison de moyennes est effectué. On travaille sur le petit effectif de douze rats, et l'on obtient  $Q_{obs}=1$ ,  $p=0,33$ . La différence de concentration moyenne en brodifacoum entre les rats sensibles et résistants n'est donc pas significative, mais le test manque comme précédemment de puissance.

## IV. CONSEQUENCES DES RESULTATS OBTENUS

### A. *Une persistance des rats malgré les traitements*

Nous venons donc de voir que suite aux traitements, la recolonisation du site par de nouveaux rats est quasiment inévitable, à moins de parvenir à éliminer tous les rats du site et des lieux alentours, comme vu dans la suite du texte. Cette persistance des rongeurs entraîne bien sûr des dégâts matériels mais présente aussi un risque sanitaire lié à la transmission de germes zoonotiques du rat à l'homme. Une étude effectuée en 2012 dans les régions de Hambourg et de Basse Saxe montre que, sur plus de 500 rats testés, plus de 25% d'entre eux sont porteurs d'une bactérie zoonotique. Les leptospires sont les plus présentes, retrouvées dans 125/586 rats, tandis que les salmonelles, les *Yersinia* et les *Coxiella* sont peu isolées (respectivement : 21/586, 6/585 et 7/524) [39]. Orienter les dératisations vers l'usage exclusif de molécules efficaces avec un plan de lutte étudié vise en outre à limiter les contaminations humaines et animales par ces bactéries, très pathogènes pour la plupart.

### B. *Une contamination durable du site par les AVK*

D'après nos résultats, les molécules utilisées pour traiter sont retrouvées pendant au moins 6 à 8 mois après traitement dans des foies de rats en bonne santé apparente. Ainsi, le site traité reste contaminé pour une longue durée après le traitement effectué. Ceci augmente le risque d'intoxications secondaires pour les prédateurs du rat (cf.infra). De plus, un milieu contaminé à bas bruit sur une longue durée représente un foyer idéal d'apparition ou d'accroissement de la résistance aux anticoagulants.

En biologie, la sélection d'un caractère – ici, la résistance aux anticoagulants – s'accompagne souvent de la perte d'un autre caractère. La diffusion du gène de résistance au sein des populations se fait en fonction de l'avantage conféré par la mutation en présence

d'anticoagulants mais aussi selon le coût biologique de cette résistance lorsque la pression de sélection est faible, en d'autres termes lorsqu'il n'y a pas d'anticoagulant dans le milieu [29].

Le coût biologique de la résistance aux anticoagulants chez le rat semble être une diminution des capacités de reproduction. En effet, l'étude de Jacobs *et al.* de 2012 [20] montre que la taille des portées issues de parents homozygotes sensibles est supérieure de 20% à celle issus de parents résistants aux AVK, un avantage reproductif des rats sensibles est noté lorsque la pression de sélection est faible. Une étude danoise de 2006 [16] a montré que lorsque la pression exercée par les anticoagulants est forte, les femelles hétérozygotes ont de façon significative plus de petits que les femelles homozygotes résistantes. On observe l'inverse pour les mâles : les homozygotes mutés ont plus de descendants. Les auteurs mettent cette constatation en relation avec le fait que les individus homozygotes mutés sont plus carencés en vitamine K1 que les rats hétérozygotes. Or, cette vitamine intervient bien sûr dans la coagulation mais aussi dans le transport du calcium, essentiel lors de l'ostéogenèse chez les femelles gestantes. Ainsi, les hétérozygotes, moins carencées, ont un succès reproductif plus important. Chez les mâles, il semble que la sélection des individus selon le critère de résistance lors d'exposition à des AVK a lieu avant la puberté, les individus résistants sont souvent plus lourds même si cette différence n'est pas significative dans l'étude. Ainsi, en cas d'exposition aux anticoagulants, les mâles homozygotes résistants sont favorisés du point de vue de la reproduction.

Un autre aspect de ce coût biologique est le besoin accru en vitamine K1 des rats homozygotes résistants : lors de carences en vitamine K dans le milieu et en l'absence d'AVK dans ce milieu, les temps de coagulation sont bien plus augmentés chez les rats homozygotes résistants que chez les hétérozygotes car la modification de structure de l'enzyme VKOR induite par la mutation entraîne un recyclage de la vitamine K moins efficace [20]. Toutefois, ce coût n'a pas été mis en évidence chez les rats résistants Y139F (données USC-INRA).

Le coût biologique de la résistance aux AVK existe donc bien potentiellement en termes de besoins en vitamine K1 et de succès reproductif ; la diffusion du gène de résistance se fait selon la pression exercée par les AVK en relation avec l'avantage évident qu'est la survie permise par le gène de résistance lors d'exposition aux anticoagulants.

### ***C. Traitements et intoxications secondaires***

De très nombreux cas d'intoxications secondaires suite à l'utilisation d'anticoagulants sont décrits. Pour illustrer ce phénomène, nous prendrons deux exemples, respectivement relatifs aux oiseaux de proie et aux renards.

Une étude de 2008 a montré que le risque d'intoxications secondaires est majoré pendant les quinze à vingt jours qui suivent un traitement à la bromadiolone pour les charognards, et pendant les 6 à 7 jours post traitement pour les prédateurs de proies vivantes : en effet, en plus des rats résistants qui survivent, tous les rats sensibles ne sont pas encore morts à ce moment là [40].

Les rapaces sont particulièrement touchés par ces intoxications secondaires, et notamment avec des molécules récentes qui persistent jusqu'à six mois dans les foies de rongeurs. Une étude canadienne a consisté à doser les résidus de bromadiolone, de brodifacoum et de difénacoum dans les foies de chouettes effraies, de grands ducs et de faucons à queue rouge, retrouvés morts suite à des accidents de la voie publique. L'étude a montré que 65% des faucons autopsiés avaient des taux d'AVK détectables dans le foie. Ces résultats sont transposables à l'Etat de New York, au sein duquel la moitié des faucons à queue rouge et la majorité des grands ducs sont contaminés par les anticoagulants. Cette utilisation accrue des anticoagulants conduit donc à une contamination des chaînes alimentaires [43]. De même sur des crécerelles, des chouettes hulottes et des chouettes effraies accidentées en Loire Atlantique et dont les foies ont été analysés : 73% des oiseaux prélevés dans cette région sont contaminés aux anticoagulants. Une étude japonaise de 2010 [48] montre que l'activité des cytochromes P450 chez les chouettes étudiées est très faible, entraînant une faible détoxification du coumafène. Cette activité est bien plus faible que chez les autres espèces d'oiseaux étudiées, telles le poulet ou l'autruche. Ceci permettrait d'expliquer l'implication majoritaire des chouettes dans les intoxications secondaires.

Les intoxications secondaires affectent également des mammifères, tel que le renard. Une étude irlandaise [45] montre que 84% des 115 renards étudiés ont consommé des AVK, dont les résidus sont présents en quantités détectables dans le foie. Une différence significative est montrée entre l'exposition des renards en Irlande du nord, plus forte, et cette

même exposition au Royaume-Uni. Les chercheurs ont établi un lien avec une plus faible diversité de petits mammifères, proies du renard, en Irlande. Cette plus faible diversité est due à une moindre recolonisation de l'Irlande par ces petits mammifères suite à la dernière glaciation, avant que cette terre ne redevienne une île.

Toutes ces conséquences de l'emploi d'anticoagulants s'inscrivent dans la notion d'écotoxicologie. Il s'agit de la « science qui prédit les effets des agents potentiellement toxiques sur les écosystèmes naturels et sur les espèces non cibles » [18]. En effet, les AVK sont retrouvés, comme vu précédemment, chez les espèces non cibles, mais également dans les eaux et les sols, qui participent à la chaîne trophique de contamination, notamment via les invertébrés.

## ***D. Finalement, comment contrôler une population de rats ?***

### **1. Une utilisation raisonnée des AVK**

Ainsi, la gestion d'un foyer de rats apparaît problématique. Deux possibilités s'offrent à nous à ce jour. Soit l'on choisit de traiter avec d'anciennes molécules, dont l'efficacité n'est pas garantie en raison de la résistance, et donc dont l'utilisation ne fait qu'accentuer encore plus la pression de sélection sur l'allèle de résistance. Certes, le choix de ces molécules en situation d'infestation modérée permet de limiter une probable apparition de résistance aux molécules récentes mais quelques rats résistants risquent de persister, menant à l'échec du traitement.

Une autre position consiste à utiliser d'ores et déjà une molécule puissante, récente et efficace, sur une période limitée, avec le risque d'apparition dans un futur plus ou moins proche d'une résistance aux AVK de dernière génération, sans autre molécule disponible à ce jour pour contrer ce phénomène.

Au Royaume-Uni, l'usage du flocoumafène et du brodifacoum est uniquement autorisé à l'intérieur d'un bâtiment, afin de limiter l'étendue de la dissémination des appâts par les rats et le risque d'intoxication secondaire [45].

Il est possible que la limitation du développement du phénomène de résistance repose non pas uniquement sur le choix des molécules employées, mais aussi sur le mode

d'utilisation de ces molécules. Ainsi, disposer l'appât dans une boîte d'appâtage et non directement dans les galeries creusées par les rats empêche les rongeurs de prélever des stocks de molécules qu'ils n'ingèrent pas, ce qui limite donc la contamination de la nouvelle population qui prendra la place de la population traitée. Cependant, ces boîtes d'appâtage entraînent souvent un phénomène de néophobie auquel le rat est très sensible, ce qui retarde l'ingestion de l'appât par les rongeurs. Un essai mené au Royaume-Uni vise à comparer la consommation d'appâts par le rat selon que cet appât est dans une boîte, du type de celle-ci-dessous, ou placé sur un plateau de bois [6]. Trois modèles différents de boîtes d'appâtage sont utilisés ; l'appât est constitué de blé non traité. Les résultats sont éloquentes : sur 12 jours d'exposition, les rats ont consommé de 4,27kg à 4,40kg de blé dans les boîtes et 36,85kg du blé qui était sur le plateau en bois. Ces différences de consommations ne sont pas imputables au lieu de placement des appâts car une correction est effectuée. Le plateau de bois limite particulièrement la néophobie, mais son usage est à réserver aux sites auxquels les enfants et les espèces non cibles ne peuvent pas accéder. Inglis *et al.* [19] proposent de laisser les boîtes d'appâtage en place après un traitement : ainsi, les rats de la nouvelle population qui s'installe voient la boîte comme partie intégrante de l'environnement. Il est utile de laisser de façon ponctuelle de l'aliment appétant dans la boîte, pour que les rats gardent l'habitude d'y entrer. Elles seront alors plus efficaces lorsqu'un nouveau traitement anticoagulant sera nécessaire, la période de latence sera nettement plus courte.



*Fig. 31 : Boîte d'appâtage.*

De plus, il semble préférable de ne réaliser que des appâtages ponctuels, afin de limiter la dissémination des appâts par les rats, phénomène observé lors de traitements prolongés.

Par ailleurs, l'utilisation d'AVK doit être réservée à des sites où la présence de rats est avérée, la première mesure de lutte contre les rats dans les fermes reste de limiter l'accès des rats à la nourriture du bétail. Ceci limite d'une part l'attrait que représente le site pour les rats, mais restreint aussi la compétition que l'on observe lors d'un traitement aux anticoagulants entre les appâts et les sacs de grains accessibles aux rats : les appâts sont moins ingérés et l'efficacité du traitement est bien moindre. Limiter l'accès de l'aliment du bétail aux rongeurs s'avère être une des premières mesures de prophylaxie à appliquer contre les rongeurs.

Un essai mené en Allemagne en 2003 [9] dans 25 fermes, avec 20% de rats résistants à la bromadiolone, a permis de déterminer les sites de placement des appâts qui se révèlent indispensables pour une lutte efficace contre les rats. Les chercheurs ont réalisé un point 0 pour chacune des fermes, et ont établi la liste des sites de l'élevage où les éleveurs devaient placer les appâts. Ces sites correspondent aux bâtiments, au sol, aux lieux de stockage du vieux matériel et de l'aliment du bétail, aux piles de bois ou de matériaux de construction, aux lieux de stockage du foin et de la paille. Six à huit semaines après traitement, le respect des mesures par les éleveurs a été quantifié. Lorsque plus de 75% du protocole est respecté, l'éradication des rats est toujours totale. Dans les fermes où l'éradication totale n'a pas fonctionné, seul 51% du protocole en moyenne a été respecté. A l'issue de cet essai, un programme informatique a été établi : l'éleveur entre sur le logiciel tous les plans de sa ferme, et le programme lui décrit où poser les appâts et établit le calendrier des opérations de dératisation (lien <http://www.baytool.de> pour le site allemand, site à mettre à jour car le programme informatique donnant le protocole de dératisation ne fonctionne pas). Ce programme a été utilisé quelques mois après l'essai précédent lors d'une épidémie de peste porcine classique, pour laquelle le rat peut servir de véhicule passif au virus. La dératisation a fonctionné dans toutes les fermes ayant mis en place le protocole décrit.

Une des erreurs classiques lors de dératisation est de sous-estimer la population de rats effectivement présente, et de ne concentrer la pose d'appâts qu'aux lieux où les traces de passages de rats sont évidentes. Voici ci-après le plan du poulailler obtenu à l'aide de l'outil [www.baytool.de](http://www.baytool.de).

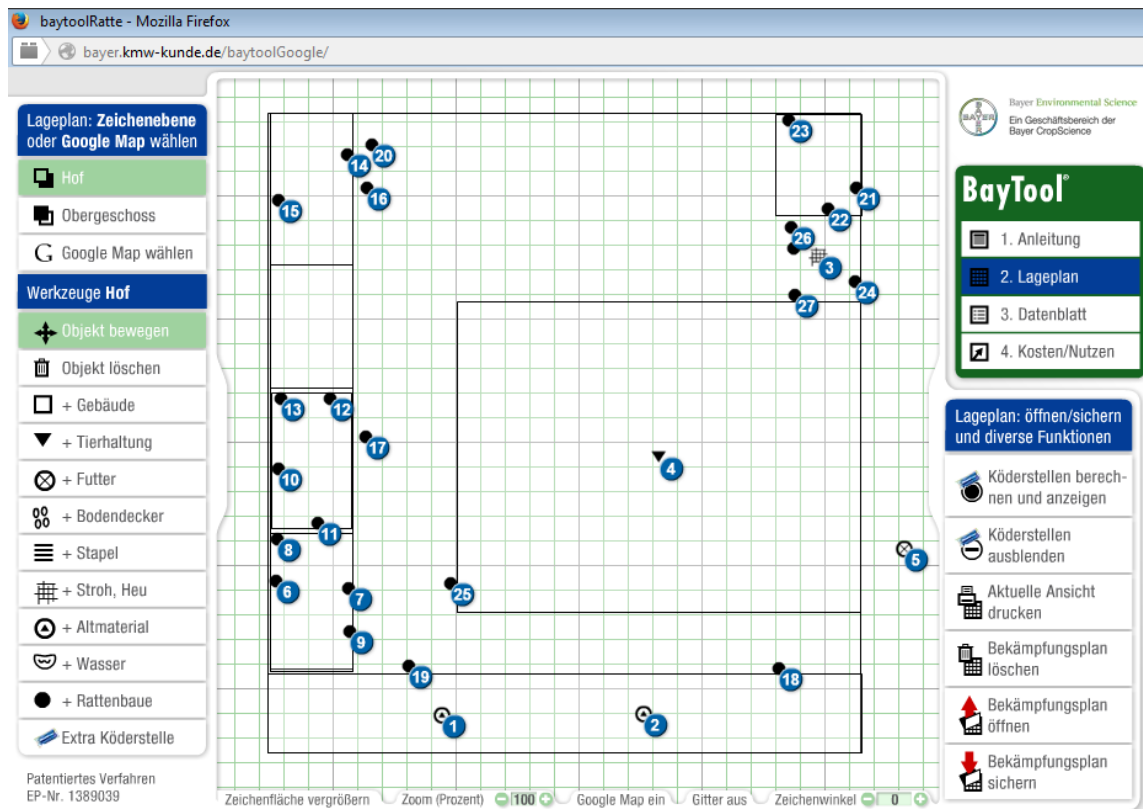


Fig.32 : Plan du poulailler 1 tel que tenté sur le site www.baytool.de

Finalement, éliminer les rats malgré une forte pression de résistance demeure possible, mais nécessite l'utilisation de molécules efficaces, placées dans tous les bâtiments de l'élevage. L'objectif de traitement doit être l'élimination de tous les rats sans exception, ce qui implique l'utilisation de molécules pour lesquelles il n'existe pas de résistance et une réflexion quant au mode d'utilisation de ces molécules.

## 2. Méthodes adjuvantes aux AVK

L'utilisation d'AVK dans la lutte contre les rats est incontournable, d'une part car ils restent malgré tout la famille de raticides la plus efficace à ce jour, et une des seules autorisées suite à l'interdiction de raticides non anticoagulants anciennement utilisés et pour lesquels il n'existe pas d'antidote.



Cependant, une meilleure réussite des traitements avec les AVK nécessite d'allier plusieurs stratégies d'éviction des rats. Comme nous l'avons vu précédemment, ne pas laisser les contenants d'aliment du bétail en libre accès limite la compétition entre cet aliment et les appâts déposés.

Des essais ont été menés quant à l'utilisation de répulsifs dans les fermes, mais leur effet est uniquement temporaire. Par ailleurs, l'utilisation de phéromones est à l'étude, toujours dans un but de répulsion.

L'amélioration des bâtiments, l'élimination des points d'entrée des rongeurs, le stockage correct des aliments et des déchets constituent autant de solutions techniques de prévention de l'infestation qui doivent être intégrées dans la mise en place d'une stratégie de contrôle sur le long terme des infestations de rats.

Une autre possibilité consiste à tenter de contrôler la fertilité de la population de rats, afin de limiter l'accroissement de la population et d'optimiser le traitement anti-vitamine K. En effet, un appât nommé ContraPest® est testé autour de la ville de New York : il est distribué une fois par jour pendant 15 jours, durée à l'issue de laquelle il y a diminution de 50% des follicules actifs chez la femelle. L'effet est ensuite permanent, d'après la compagnie, mais peu d'informations sont disponibles quant à l'efficacité de ce produit.

Enfin, lors de faible infestation par les rongeurs, la simple utilisation de trappes de piégeage demeure possible, tout en restant vigilant : si des témoins de présence de rats persistent, l'utilisation d'AVK devient indispensable.

Une amélioration de notre étude pour confirmer ses principaux résultats pourrait éventuellement consister en l'utilisation d'AVK comportant des isotopes stables de carbone marqué : il serait alors possible de suivre la contamination par les AVK dans les populations successives de rats et de confirmer l'origine de l'exposition.

## CONCLUSION

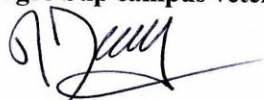
Nous avons donc montré par cette étude menée en parallèle sur deux sites avec deux molécules différentes que lors d'un traitement anticoagulant, les rats traités stockent des appâts, ce qui perpétue pendant des mois la présence de la molécule sur le site qui est colonisé par une nouvelle population de rongeurs et se retrouve dans l'organisme des nouveaux rongeurs installés sur le site à des teneurs très faibles.

Ces traitements s'accompagnent d'une augmentation de la fréquence de présence de l'allèle de résistance lié à la mutation Y139F, ce qui laisse supposer une pression de sélection effective des molécules les plus récentes lorsque les teneurs sont trop faibles pour éliminer les rats.

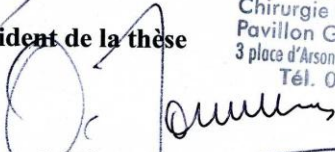
La gestion d'un site infesté de rats n'en est que plus ardue et nécessite l'application d'une méthode étudiée de dératisation avec comme objectif l'élimination de la totalité des rongeurs, en ciblant correctement les sites de placement d'appâts et les molécules utilisées. Une lutte empirique ne suffit plus.

**Thèse de Melle Hélène Defrance**

**Le Professeur responsable  
VetAgro Sup campus vétérinaire**



**Le Président de la thèse**



**Vu et permis d'imprimer**

Lyon, le **09 AVR. 2014**

**Pour le Président de l'Université,  
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,  
Professeur F. N. GILLY**



**Le Directeur général  
VetAgro Sup**

Par délegation  
**Pr F. Grain - DEVE**  
  
VetAgro Sup  
Campus Vétérinaire

## BIBLIOGRAPHIE

1. ACADEMIE DE NANCY-METZ, (page consultée le 19/06/2013), Chromatographie liquid haute performance (HPLC), [en ligne], [http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/chim/Jumber/HPLC/chromatographie\\_en\\_phase\\_liquide.htm](http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/chim/Jumber/HPLC/chromatographie_en_phase_liquide.htm)(1916)
2. BAERT K., STUYCK J., BREYNE P., MAES D., CASAER J. (2012): Distribution of anticoagulant resistance in the Brown rat in Belgium. *Belg. J. Zool.*, 142, p.39-48
3. BERNY P. (2011): Challenges of Anticoagulant Rodenticides: Resistance and Ecotoxicology. In: Intech (eds), *Pesticides in the Modern World Book 5*, p.1-30
4. BIOTECH ROUEN, (page consultée le 19/06/2013), HPLC Principe et appareillage, [en ligne], <http://www.biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>
5. BRAKES C., SMITH R. (2005): Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *Journal of Applied Ecology*, 42, p.118-128
6. BUCKLE A.P., PRESCOTT C.V. (2011): Effects of tamper-resistant bait boxes on bait uptake by Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *International Journal of Pest Management*, 57, p.77-83
7. BUCKLE A.P., PRESCOTT C.V., WARD K.J. (1994): Resistance to the first and second generation anticoagulant rodenticides - a new perspective. In: W.S. Halverson & A.C. Crabbs (eds), *Proceedings of the Sixteenth Vertebrate Pest Conference*, University of California, 16/02/1994, p.138-144

8. COSSON J.F. (2013): ANR Rodent - Synthèse des analyses génétiques, “communication personnelle”
9. ENDEPOLS S., KLEMMANN N., PELZ H.J. et al. (2003): A scheme for the placement of rodenticide baits for rat eradication on confinement livestock farms. In: Elsevier (eds), Preventive Veterinary Medicine, vol.58, issues 3-4, p.115-123
10. FOUREL I., HUGNET C., GOY-THOLLOT I., BERNY P. (2010): Validation of a New Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Ion-Trap Technique for the Simultaneous Determination of Thirteen Anticoagulant Rodenticides, Drugs, or Natural Products. Journal of Analytical Toxicology, vol.34
11. FREIRE-MORAN L., ARONSSON B., MANZ C., GYSSENS I.C., SO A.D., MONNET D.L. et al. (2011): Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug resistant bacteria. Time to react is now. In: Elsevier (eds), Drug Resistance Updates, 14, p.118-124
12. GAMELIN L., HARRY P. (2005): Rodenticides. EMC-Toxicologie Pathologie 2, p.89-97
13. GRANDEMANGE A., KOHN M., LASSEUR R., LONGIN-SAUVAGEON C., BERNY P., BENOIT E. (2009): Consequences of the *Y139F Vkorc1* mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7th generation of congenic *Y139F* strain of rats. Pharmacogenet Genomics, 19, (n°10), p.742-750
14. GRANDEMANGE A., LASSEUR R., LONGIN-SAUVAGEON C., BENOIT E., BERNY P.(2010): Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. Pest Manag. Sci, 66, p.270-276
15. GREAVES J.H., SHEPHERD D.S., QUY R. (1982): Field trials of second generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations. Journal of Hygien, 89, p.295-301

16. HEIBERG A.C., LEIRS H., SIEGISMUNG H. (2006): Reproductive success of bromadiolone-resistant rats in absence of anticoagulant pressure. *Pest Manag. Sci*, 62, p.862-871
17. HODROGE A., LONGIN-SAUVAGEON C., FOUREL I. (2011): Biochemical characterization of spontaneous mutants of rats VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 515, p.14-20
18. HOFFMAN D.G., RATTNER B.A., BURTON G.A., CAIRNS J. (2003): *Handbook of ecotoxicology*, 2nd edition, ed. Lewis Publishers, 1315
19. INGLIS I.R., SHEPHERD D.S., SMITH P., HAYNES P.J., BULL D.S., COWAN D.P. et al. (1996): Foraging behavior of wild rats (*Rattus norvegicus*) towards new foods and bait containers. In Elsevier (eds), *Applied Animal Behaviour Science*, 47, p.175-190
20. JACOB J., ENDEPOL S., PELZ H.J., KAMPLING E., COOPER T.G., YEUNG C.H. et al. (2012): Vitamin K requirement and reproduction in bromadiolone resistant Norway rats. *Pest Manag. Sci*, 68, p.378-385
21. JACOB J., FREISE J.F. (2011) : Food choice and impact of food sources from farms on blood coagulation in rodenticide resistant Norway rats. *Crop Protection* (2011), doi: 10.1016/j.cropro.2011.06.009
22. LASSEUR R., GRANDEMANGE A., LONGIN-SAUVAGEON C., BERNY P., BENOIT E. (2007): Comparison of the inhibition effect of different anticoagulants on vitamin K epoxide reductase activity from warfarin-susceptible and resistant rat. In: Elsevier (eds), *Pesticide Biochemistry and physiology*, 88, p.203-208
23. LASSEUR R., LONGIN-SAUVAGEON C., VIDEMANN B., BILLERET M., BERNY P., BENOIT E. (2005): Warfarin resistance in a French strain of rats. *J.Biochem Mol Toxicol.*, 19, (n°6), p.379-385

24. LE BONNIEC B. (2004): La cible de la warfarine identifiée. *Médecine sciences*, vol.20, n°5, p.512-514
25. LEMARCHAND C., ROSOUX R., BERNY P. (2010): Organochlorine pesticides, PCBs, heavy metals and anticoagulant rodenticides in tissues of Eurasian otters (*Lutra lutra*) from upper Loire River catchment (France). In: Elsevier (eds), *Chemosphere*, 80, p.1120-1124
26. LEON V., FRASCHINA J., BUSCH M. (2009): Rodent control at different spatial scales on poultry farms in the province of Buenos Aires, Argentina. In: Elsevier (eds), *International Biodeterioration and biodegradation*, 63, p.1113-1118
27. LEVENGOOD J., BEASLEY V. (2007): Principles of ecotoxicology. In: AP (eds), *Veterinary Toxicology*, ed. Ramesh C.Gupta, p.689-704
28. MARKUSSEN M.D.K., HEIBERG A.C., FREDHOLM M., KRISTENSEN M. (2008): Identification of cytochrome P450 differentiated expression related to developmental stages in bromadiolone resistance in rats (*Rattus norvegicus*). In: Elsevier (eds), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91, p.147-152
29. MATAGRIN B., HODROGE A., MONTAGUT-ROMANS A., ANDRU J., FOUREL I., BESSE S. et al. (2013) : Newinsights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1). The catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explain the biological cost associated to mutations. *FEBS Open Bio* 3, p.144-150
30. MURPHY M. (2007): Anticoagulant rodenticides. In : AP (eds), *Veterinary Toxicology*, ed. Ramesh C.Gupta, p.525-539
31. NEWMAN M. et UNGER M. (2003): Bioaccumulation from food and trophic transfer. In : Lewis Publishers, *Fundamentals of ecotoxicology*, 2nde edition, p.95-110

32. PELZ H.J., KLEMANN N. (2004): Rat control strategies in organic pigs and poultry production with special reference to rodenticide resistance and feeding behavior. *NJAS*, 52, 2, p.173-184
33. PELZ H.J., ROST S., HUNERBERG M., FREGIN A., HEIBERG A.C., BAERT K. et al. (2005) : The genetic basis of Resistance to Anticoagulants in Rodents. *Genetics*, 170, (n°4), p.1839-1847
34. POPPENG R. (2007): Avian Toxicology. In: AP (eds), *Veterinary Toxicology*, ed. Ramesh C.Gypta, p.663-678
35. PRESCOTT C.V., BUCKLE A.P. (2000): Blood-clotting response tests for resistance to difacinone and chlorophacinone in the Norway Rat (*Rattus norvegicus*, Berk.). *Crop protection*, 19, p.291-296
36. PRESCOTT C.V., BUCKLE A.P., HUSSAIN I., ENDEPOLS S. (2007)/ A standardized BCR resistance test for all anticoagulant rodenticides. *International Journal of Pest Management*, 53, p.265-272
37. RICHARDS C.G.J. (1981): Field trials of bromadiolone against infestations of warfarin-resistant *Rattus norvegicus*. *Journal of Hygien*, 86, p.363-367
38. ROST S., PELZ H.J., MENZEL S., MACNICOLL A., LEON V., SONG K.J. et al. (2009): Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genetics*, 10, (n°4)
39. RUNGE M., VON KEYSERLINGK M., BRAUNE S., BECKER D., PLENGE-BONIG A., FREISE J. et al. (2012) : Distribution of rodenticide resistance and zoonotic pathogens in Norway rats in Lower Saxony and Hamburg, Germany. *Pest Manag. Sci.*, doi 10.1002/ps.3369

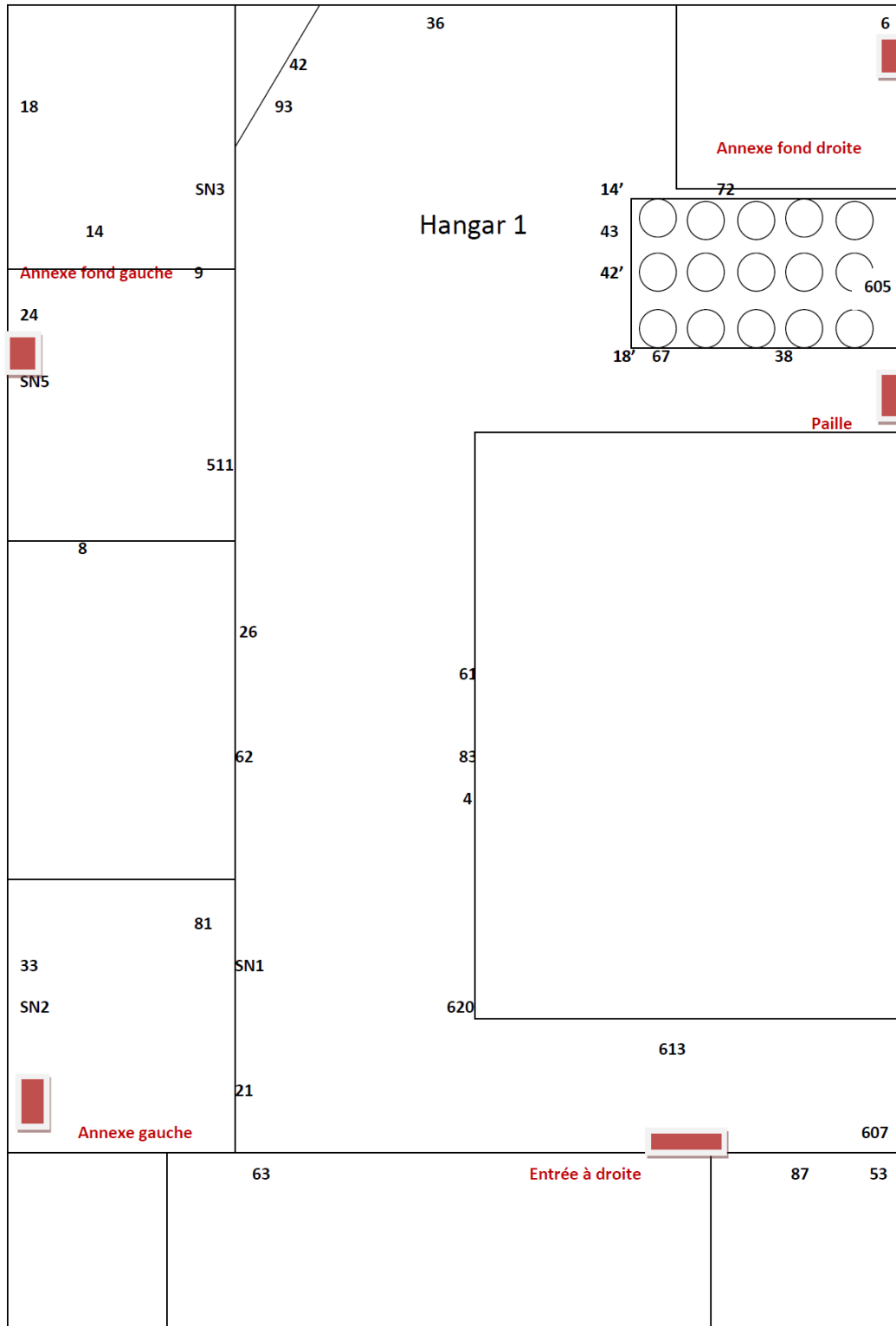
40. SAGE M., COEURDASSIER M., DEFAUT R., GIMBERT F., BERNY P., GIRAUDOUX P. (2008): Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of the water vole, *Arvicola terrestris*. In: Elsevier (eds), Science of the total environment, p.211-222
41. SAGE M., COEURDASSIER M., DEFAUT R., LUCOT E., BARBIER B., RIEFFEL D. et al. (2007): How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*? In: Elsevier (eds), Environmental Pollution, vol.148, p.372-379
42. TANAKA K., KAWAI Y., IKENAKA Y., HARUNARI T., TANIKAWA T., ANDO S. (2012): The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. In: Elsevier (eds), Pesticide Biochemistry and Physiology, 103, p.144-151
43. THOMAS P., MINEAU P., CHORE R., CHAMPOUX L., MARTIN P., WILSON L. et al. (2011): Second generation anticoagulant rodenticides in predatory birds: Probabilistic characterisation of toxic liver concentrations and implications for predatory bird populations in Canada. In: Elsevier (eds), Environmental International, 37, p.914-920
44. TOBIN M.E., FALL M.W. (2004): Pest control : rodents. USDA National Wildlife Research Center, Staff Publications, paper 67
45. TOSH D.G., MCDONALD R.A., BEARHOP S. et al. (2011): Does small mammal prey guild affect the exposure of predators to anticoagulant rodenticides? In: Elsevier (eds), Environmental Pollution, vol.159, issue 10, p.3106-3112
46. UNIVERSITE JUSSIEU, (page consultée entre le 20/04/2013 et le 08/02/2014), BiostaTGV Accueil, [logiciel], <http://www.u707.jussieu.fr/biostatgv/>
47. VEIN J., GRANDEMANGE A., COSSON J.F., BENOIT E., BERNY P. (2011): Are water vole resistant to anticoagulant rodenticides following field treatments? In: Springer (eds), Ecotoxicology, vol.20, issue 6, p.1432-1441



48. WATANABE K.P., SAENTIENCHAI A., TANAKA K.D., IKENAYA Y., ISHIZUKA M. (2010): Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species. In: Elsevier (eds), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 152, p.114-119
49. YOSHIZAWA M., HAYASHI H., TASHIRO Y. (2009): Effect of VKORC1-1639 G>A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients. In: Elsevier (eds), *Thrombosis Research*, 124, p.161-166

# ANNEXE 1: Plan du poulailler 1

(rectangles rouges : plateaux, les numéros sont ceux des pièges)



## ANNEXE 2 : Base de données de Marcy (concentrations en ng/g)

Name	Area	Gender	Age	Weight g	Length cm	Etat	VKOR	Hemorr	BROM	BFN	DFN	DFTL
MAR001	A	M	Ad	301,0	26,6	alive	R	N	17,3	0,0	0,5	0,0
MAR002	A	F	Juv	124,0	16,0	dead	I	N	9118,8	15,4	31,3	0,0
MAR003	B	F	Ad	343,0	21,1	alive	R	N	8,0	0,0	0,0	0,0
MAR004	B	M	Juv	139,5	18,3	dead	R	N	95,2	0,0	0,0	0,0
MAR005	B	F	Ad	258,0	21,0	alive	R	N	1989,2	0,0	1,9	0,0
MAR006	B	M	Ad	269,0	21,1	dead	R	N	11,5	0,0	0,0	0,0
MAR007	B	F	Bb	39,0	11,3	dead	R	N	56,7	0,0	0,0	0,0
MAR008	B	M	Bb	30,0	10,4	dead	R	N	20,2	0,0	0,0	0,0
MAR009	A	M	Juv	127,5	16,6	dead	R	N	9544,8	23,0	26,2	0,0
MAR010	B	M	Bb	51,5	12,5	dead	R	N	781,9	0,0	0,0	0,0
MAR011	B	M	Bb	60,0	12,2	dead	R	N	4919,4	1,6	7,0	0,0
MAR012	B	M	Juv	158,0	18,5	dead	R	N	6387,9	2,2	71,4	0,0
MAR013	B	F	Ad	267,8	19,7	dead	R	N	1683,7	0,0	7,9	0,0
MAR014	B	F	Bb	35,0	12,5	dead	I	N	580,4	0,0	4,4	0,0
MAR015	B	M	Ad	300,4	22,0	dead	I	N	3626,9	2,6	5,8	0,0
MAR016	A	M	Bb	65,4	12,4	dead	I	N	97,6	15,9	1788,9	0,0
MAR017	B	F	Juv	160,7	16,8	dead	I	N	5,2	0,0	0,0	0,0
MAR018	B	F	Ad	273,0	21,0	dead	R	N	106,0	0,0	115,6	6,0
MAR019	B	M	Bb	85,4	15,0	dead	I	N	554,3	0,0	106,0	0,0
MAR020	B	F	Ad	330,6	24,8	dead	I	N	2023,0	6,1	15,1	6,3
MAR021	B	F	Bb	74,7	15,3	alive	I	N	238,5	0,0	2,3	0,0
MAR022	B	M	Ad	218,0	21,6	alive	R	N	47,5	0,0	0,0	0,0
MAR023	B	M	Juv	177,3	18,0	dead	R	N	0,0	0,0	0,0	0,0
MAR024	B	F	Juv	166,8	17,4	dead	R	N	6,3	0,0	0,0	0,0
MAR025	C	M	Bb	70,7	12,2	dead	I	N	3,5	0,0	0,0	0,0
MAR026	C	F	Juv	180,1	19,0	dead	I	N	3,1	0,0	0,0	0,0
MAR027	C	M	Ad	214,8	18,7	dead	S	N	9,7	0,0	0,0	0,0
MAR028	C	F	Ad	266,0	17,4	dead	I	N	2,0	0,0	0,0	0,0
MAR029	B	F	Ad	297,0	21,7	dead	R	Y	5006,3	6,9	16,3	7,5
MAR030	B	M	Bb	44,7	11,6	dead	I	Y	3576,7	0,0	2,4	0,0
MAR031	B	F	Ad	277,8	19,0	dead	R	Y	455,7	3562,1	71,2	0,0
MAR032	B	M	Juv	176,4	18,2	dead	R	Y	0,0	1281,4	8,0	0,0
MAR033	B	F	Juv	119,2	17,7	dead	I	Y	976,6	3612,0	21,7	0,0
MAR034	B	M	Bb	48,4	13,8	dead	S	Y	202,5	991,6	5,0	0,0
MAR035	B	F	Ad	416,2	24,6	dead	R	Y	5542,7	750,0	4,9	3,8
MAR036	B	M	Juv	117,5	14,7	dead	R	Y	37,1	243,1	2,2	0,0

MAR037	C	M	Bb	80,2	14,7	dead	R	Y	2,6	1018,3	0,8	0,0
MAR038	B	F	Bb	47,6	11,5	dead	I	Y	68,6	529,9	1,3	0,0
MAR039	C	M	Juv	150,4	17,0	dead	I	Y	1,1	2199,8	9,7	0,0
MAR040	B	M	Bb	70,8	14,0	dead	I	Y	103,0	1140,5	3,4	0,0
MAR041	B	M	Ad	193,5	18,5	dead	R	Y	1346,2	3214,8	12,7	0,0
MAR042	C	F	Ad	277,1	21,1	dead	R	Y	1903,5	2266,8	10,8	0,0
MAR043	B	F	Ad	320,8	18,4	dead	R	Y	327,6	4061,7	7,0	0,0
MAR044	B	F	Ad	263,9	20,0	dead	R	Y	28,9	2859,8	12,5	0,0
MAR045	B	M	Ad	206,3	18,6	dead	R	Y	25,4	2145,4	4,3	0,0
MAR046	B	F	Ad	211,5	18,1	dead	R	Y	3464,0	1412,8	14,4	0,0
MAR047	B	M	Juv	118,8	17,5	dead	I	Y	188,6	1399,2	6,7	0,0
MAR048	B	M	Bb	15,8	7,6	dead	R	N	19,5	263,1	0,5	0,0
MAR049	B	F	Ad	325,0	20,5	dead	R	Y	25,3	2415,3	6,2	0,0
MAR050	B	F	Ad	356,0	22,1	dead	I	Y	275,2	2104,2	12,8	0,0
MAR051	D	F	Ad	251,3	21,5	dead	S	Y	0,9	157,8	0,0	0,0
MAR052	D	M	Juv	173,2	18,1	dead	R	Y	1,1	1194,4	3,8	0,0
MAR053	B	M	Ad	354,7	21,0	dead	R	Y	83,2	3082,8	9,8	0,0
MAR054	B	F	Ad	289,1	19,5	dead	NA	Y	76,8	1973,0	52,2	27,7
MAR055	B	F	Bb	30,3	10,6	dead	NA	N	6,1	3111,7	9,5	15,1
MAR056	A	M	Ad	408,2	23,2	dead	NA	Y	936,1	23,7	340,3	0,0
MAR057	B	F	Ad	228,9	23,0	dead	NA	N	73364,0	2747,2	167,6	5,8
MAR058	C	M	Bb	50,1	12,5	dead	NA	N	62,4	36931,5	7,8	0,0
MAR059	C	M	Bb	25,1	10,5	dead	NA	NA	13,9	33,4	0,0	0,0
MAR060	C	M	Bb	50,0	11,5	dead	NA	Y	8,2	2870,4	0,0	0,0
MAR061	B	M	Ad	250,0	22,5	alive	R	N	534,0	335,3	87,0	0,0
MAR062	B	F	Ad	175,0	19,0	alive	I	N	2042,3	616,1	15,0	0,0
MAR063	B	M	Ad	210,0	21,5	alive	R	N	437,4	285,4	0,0	3,6
MAR064	B	F	Ad	220,0	20,0	alive	I	N	584,9	408,6	12,8	0,0
MAR065	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MAR066	B	F	Ad	185,0	20,0	dead	R	NA	5,0	121,3	1941,5	0,0
MAR067	E	M	Ad	185,0	17,5	alive	S	N	4364,3	4,6	9,6	0,0
MAR068	E	M	Ad	250,0	20,0	alive	I	N	2396,8	4,9	2,7	0,0
MAR069	B	F	Juv	80,0	14,5	alive	R	N	101,6	52,9	7,8	0,0
MAR070	E	F	Ad	200,0	19,5	alive	I	N	5237,5	8,3	4,8	0,0
MAR071	E	M	Ad	285,0	20,5	alive	I	N	847,5	4,3	0,0	0,0
MAR072	E	F	Bb	35,0	10,5	alive	R	N	24,4	7,4	9,2	0,0
MAR073	E	F	Juv	135,0	16,0	alive	I	N	4800,8	7,8	0,0	0,0
MAR074	B	F	Juv	110,0	15,5	alive	NA	N	584,4	1535,1	12,3	0,0

### ANNEXE 3 : Base de données du poulailler (concentrations en ng/g)

Name	Gender	Age	Weight g	Length cm	Status	VKOR	Hemorr	BROMA	DFN	BRDF	DFTL
ROM 0428	M	juv	95.0	15.4	dead	R	NA	0,0	0,5	0,0	13,9
ROM 0429	M	juv	85.0	16.1	dead	R	NA	1618,3	6,6	4,0	11,6
ROM 0430	M	juv	70.5	15.4	dead	R	NA	131,6	0,6	0,0	6,5
ROM 0431	F	ad	218.0	20.3	dead	I	NA	232,7	1,0	0,7	8,5
ROM 0432	F	juv	90.3	15.8	dead	R	NA	1,6	38,5	8,6	160,6
ROM 0433	F	ad	253.0	22.7	dead	I	NA	301,9	1,0	0,7	29,4
ROM 0446	M	ad	236.5	23.4	alive	R	NA	2,1	37,9	4,5	1209,7
ROM 0447	F	juv	91.0	16.6	alive	R	NA	329,7	1,0	1,0	132,0
ROM 0653	F	ad	312,3	24,4	alive	R	NA	187,4	0,5	0,5	337,8
ROM 0670	F	ad	227,9	22,1	alive	I	NA	0,0	0,3	0,0	11,8
PP01	F	Juv	145	20	dead	NA	NA	0,0	0,0	0,0	4,0
PP02	F	Juv	145	18,5	dead	R	NA	107,4	21,4	0,0	1677,1
PP03	F	Juv	160	19,5	dead	NA	NA	18,3	0,0	3,6	17118,3
PP04	F	Juv	125	18,5	dead	NA	NA	13,1	1,9	3,4	28,6
PP05	F	Bb	65	19,5	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP06	F	Ad	260	20,5	dead	NA	NA	127,6	318,1	3,5	29855,0
PP07	F	Ad	310	22	dead	NA	NA	35,9	3,4	3,3	19189,8
PP08	M	Ad	275	22,5	dead	NA	NA	51,0	0,0	3,6	21002,2
PP09	F	Juv	135	16,5	dead	NA	NA	692,1	32,9	3,4	15148,9
PP10	F	Juv	110	18	dead	NA	NA	68,1	7,4	3,2	19264,3
PP11	M	Ad	370	22	dead	NA	NA	33,2	65,2	0,0	25086,3
PP12	F	Juv	170	19,5	dead	NA	NA	13,1	0,0	2,4	15264,5
PP13	M	Ad	315	23,5	dead	NA	NA	68,5	11,4	4,6	43296,5

PP14	M	Juv	110	18	dead	NA	NA	15,9	21,7	0,0	15733,9
PP15	F	Juv	135	17	dead	NA	NA	40,9	69,2	6,4	46720,9
PP16	F	Juv	125	16,5	dead	NA	NA	11,3	23,5	0,0	25983,9
PP17	F	Ad	210	20	dead	NA	NA	20,7	31,2	8,0	65678,2
PP18	F	Bb	85	15	dead	NA	NA	12,3	14,9	3,8	32007,5
PP19	M	Juv	125	18	dead	NA	NA	511,4	5,7	4,1	16902,6
PP20	M	Ad	315	22	dead	NA	NA	20,9	13,8	3,6	13901,7
PP21	M	Ad	315	22,5	dead	NA	NA	15,0	6,2	5,1	15737,8
PP22	M	Ad	320	22	dead	NA	NA	91,4	119,0	4,6	18593,5
PP23	M	Ad	185	19	dead	NA	NA	11,5	0,0	2,8	16072,0
PP24	M	Ad	300	22,5	dead	NA	NA	1099,9	56,4	3,5	22867,7
PP25	M	Ad	220	21	dead	NA	NA	162,8	0,0	7,2	33153,7
PP26	F	Juv	130	18	dead	NA	NA	337,0	15,6	0,0	13556,6
PP27	F	Bb	85	15	dead	NA	NA	98,7	7,0	4,8	20768,1
PP28	M	Ad	270	21	dead	NA	NA	166,3	10,8	8,7	33008,8
PP29	M	Ad	251,5	21,5	alive	NA	NA	38,2	304,1	0,0	17,3
PP30	F	Ad	179,6	19,5	alive	NA	NA	152,1	5,8	0,0	25,2
PP31	F	Ad	388,1	21	dead	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP32	F	Ad	195	20,5	alive	NA	NA	430,0	27,2	0,0	1084,6
PP33	F	Ad	185	20	alive	NA	NA	254,7	2509,9	7,0	19,4
PP34	F	Ad	365	22,5	dead	NA	NA	229,9	2121,2	13,4	36492,3
PP35	F	Ad	285	21	dead	NA	NA	517,1	242,3	7,1	29769,2
PP36	M	Bb	35	9,5	dead	NA	NA	153,6	51,9	0,0	298,2
PP37	M	Bb	35	10	dead	NA	NA	130,4	71,5	0,0	208,2
PP38	F	Ad	330	24	dead	NA	NA	251,4	649,3	16,5	14580,4
PP39	M	Ad	365	23,5	dead	NA	NA	221,0	74,4	10,5	53097,8
PP40	F	Ad	280	21,5	dead	NA	NA	508,7	24,6	8,3	114623,2
PP41	M	Ad	365	21	dead	NA	NA	157,1	122,6	4,3	29344,3

PP42	M	Ad	315	22	dead	NA	NA	21,2	4,3	4,5	43416,5
PP43	F	Ad	265	19,5	dead	NA	NA	306,1	2,2	0,0	48228,3
PP44	M	Bb	45	10,5	dead	NA	NA	209,6	81,3	0,0	125,0
PP45	F	Ad	250	21	alive	NA	NA	7,8	3,1	0,0	851,5
PP46	F	Bb	70	13	alive	NA	NA	54,6	16,9	0,0	39,2
PP47	F	Ad	235	20	dead	NA	NA	47,3	0,0	7,6	53808,0
PP48	M	Bb	65	13,5	dead	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP49	F	Bb	55	13	dead	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP50	M	Ad	260	21,5	alive	NA	NA	66,0	2,3	0,0	2950,0
PP51	M	Ad	230	21,5	alive	NA	NA	11,4	1,9	0,0	13,8
PP52	M	Ad	310	23	alive	NA	NA	0,0	0,0	0,0	0,0
PP53	M	Ad	275	21,5	dead	NA	NA	276,2	0,0	3,1	18016,2
PP54	F	Ad	250	20,5	dead	NA	NA	302,7	2,9	3,7	22896,1
PP55	M	Ad	300	22	dead	NA	NA	44,5	0,0	3,5	25000,3
PP56	M	Ad	315	21,5	dead	NA	NA	17,9	0,0	3,7	28291,2
PP57	F	Ad	220	19,5	dead	NA	NA	650,6	13,4	7,1	78358,9
PP58	M	Juv	118,4	15,5	dead	NA	NA	13,0	6,1	0,0	24185,7
PP59	M	Bb	25,8	9,5	dead	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP60	M	Bb	36,7	10	dead	NA	NA	5,1	0,0	0,0	57,4
PP61	F	Juv	155	16	dead	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP62	F	Ad	270	22	dead	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP63	F	Ad	240	19,5	dead	NA	NA	212,5	9,0	1,6	48,8
PP64	F	Ad	335,4	24	alive	NA	NA	177,7	522,2	4,0	1869,3
PP65	F	Ad	259,6	21,5	alive	NA	NA	100,2	288,7	2,7	6578,3
PP66	F	Juv	122,4	18,5	alive	NA	NA	2,6	1,0	0,0	12,6
PP67	F	Juv	129,1	17,5	alive	NA	NA	7,0	0,9	0,0	4,0
PP68	M	Bb	75	11	dead	NA	NA	45,9	0,0	0,0	50,9
PP69	F	Juv	137,9	16,5	alive	NA	NA	11,2	1,8	0,0	3,7
PP70	M	Bb	45	9	dead	NA	NA	7,3	0,0	0,0	0,0
PP71	M	Ad	205,3	20,5	alive	NA	NA	27,9	4,1	0,0	5,3
PP72	F	Juv	128,1	17	alive	NA	NA	5,4	0,0	0,0	0,0
PP73	F	Juv	110	16	dead	NA	NA	32,2	0,0	0,0	0,0
PP74	F	Bb	64,5	12,5	alive	NA	NA	0,8	6,4	0,0	1465,2
PP75	M	Bb	82,2	14,5	alive	NA	NA	1,1	6,0	0,0	1360,3
PP76	M	Ad	422	24,5	alive	NA	NA	351,5	7,4	0,0	1134,6
PP77	F	Ad	195	19	alive	NA	NA	101,4	1,1	0,0	8,3
PP78	F	Juv	131,2	17,5	alive	R	NA	5,6	1,3	0,0	4,4

PP79	F	Ad	185	19,5	dead	NA	NA	155,6	2,8	2,1	263,0
PP80	F	Ad	269,4	21,5	alive	NA	NA	65,3	2,8	0,0	4,0
PP81	M	Juv	118,2	19	alive	NA	NA	30,9	3,7	0,0	1,9
PP82	M	Bb	35	11,5	dead	NA	NA	43,4	0,0	0,0	3,3
PP83	M	Ad	383,7	25,5	alive	NA	NA	18,7	0,7	0,0	3929,7
PP84	F	Juv	165	19	dead	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP85	M	Ad	337,5	22,5	alive	NA	NA	11,2	358,3	2,7	3209,4
PP86	M	Bb	88,1	15,5	alive	NA	NA	1153,2	6,1	1,9	31,9
PP87	M	Bb	30	10	dead	NA	NA	2,7	0,0	0,0	62,0
PP88	M	Ad	249,7	22	alive	NA	NA	27,5	0,9	0,0	458,6
PP89	F	Bb	75	10,5	dead	NA	NA	296,0	6,3	0,0	7,4
PP90	M	Bb	85,5	15	alive	NA	NA	179,4	1,1	0,0	23,1
PP91	F	Bb	63,8	15	alive	NA	NA	154,8	0,9	0,0	50,9
PP92	F	Juv	105,8	17	alive	NA	NA	15,6	0,0	0,0	4,1
PP93	F	Juv	128,6	18,5	alive	NA	NA	7,8	0,0	0,0	2,7
PP94	M	Bb	55	11,5	dead	NA	NA	1399,6	7,7	3,2	133,1
PP95	F	Ad	284	22	alive	NA	NA	22,8	1,5	0,0	2826,2
PP96	M	Ad	202,8	22,5	alive	NA	NA	42,0	1,1	0,0	966,7
PP97	F	Bb	70	11,5	dead	NA	NA	2347,5	14,3	8,7	12,6
PP98	M	Bb	35	8	dead	NA	NA	905,1	5,1	0,0	11,4
PP99	M	Ad	295,8	22,5	alive	NA	NA	10,3	14,3	0,0	14,3
PP100	F	Bb	30	8,5	dead	NA	NA	6,2	0,0	0,0	91,3
PP101	M	Bb	20	8,5	dead	NA	NA	277,8	17,6	0,0	10,5
PP102	M	Ad	440	22	alive	NA	NA	9,6	0,0	0,0	6,4
PP103	F	Ad	240	20	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP104	M	Juv	98,5	16,5	alive	NA	NA	9,6	0,0	0,0	6,4
PP105	M	Bb	34	22,5	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP106	F	Ad	295	21,5	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP107	M	Ad	340	21	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP108	M	Bb	38,6	12,5	alive	NA	NA	4,8	20,9	0,0	59,5
PP109	F	Ad	275	19	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP110	F	Bb	50	9,5	dead	NA	NA	1683,7	5,1	3,5	43,7
PP111	F	Bb	65	13,5	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP112	M	Bb	9	30	alive	NA	NA	10,5	0,0	0,0	297,0
PP113	M	Bb	65	12,5	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP114	M	Bb	80	12,5	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP115	M	Ad	240	20,5	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP116	M	Bb	30	9,5	dead	NA	NA	3,1	0,0	0,0	110,3
PP117	F	Bb	35	9,5	dead	NA	NA	10,6	0,0	0,0	203,0
PP118	F	Bb	75	32,5	alive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PP119	F	Ad	272,6	21,5	alive	NA	NA	45,4	2408,0	11,4	34,2
PP120	M	Ad	437,5	22,5	alive	NA	NA	7,5	9,4	3,2	363,5
PP121	M	Ad	359,5	21	alive	NA	NA	11,2	698,7	10,4	529,5
PP122	M	Ad	253,6	21,5	alive	NA	NA	0,0	2,9	3,0	13,2



PP123	M	Ad	166,3	17,5	alive	NA	NA	1,3	43,8	2,1	1642,9
PP124	M	Ad	350	20	alive	NA	NA	0,0	189,9	0,0	1981,8
PP125	F	Ad	220	19,5	alive	NA	NA	28,8	2775,9	9,9	128,7
PP126	M	Ad	200	17	alive	NA	NA	79,8	263,5	9,1	245,4
PP127	F	Ad	255	19,5	alive	NA	NA	83,9	10,0	0,0	54,7
PP128	F	Ad	315	20,5	alive	NA	NA	142,9	2240,4	19,2	171,9
PP129	F	Ad	255	19	alive	NA	NA	8,6	705,2	3,0	93,6
PP130	M	Ad	215	19,5	alive	NA	NA	14,7	13,3	0,0	1996,1
PP131	M	Ad	320	21	alive	NA	NA	5,3	542,8	0,0	13,9
PP132	M	Ad	195	18,5	alive	NA	NA	1,6	98,0	0,0	2298,1
PP133	F	Ad	360	22,5	alive	NA	NA	80,3	725,3	17,5	43,4
PP134	M	Ad	380	22,5	alive	NA	NA	50,4	626,0	2,2	450,9
PP135	F	Ad	290	19	alive	NA	NA	17,9	3363,8	5,9	26,5
PP136	M	Ad	270	19,5	alive	NA	NA	7,1	1641,7	8,3	18,9
PP137	F	Ad	205	18	alive	NA	NA	6,7	146,0	0,0	7,9
PP138	F	Bb	25	9,5	alive	NA	NA	39,0	15,2	0,0	268,1
PP139	M	Ad	325	20	alive	NA	NA	14,6	1259,6	5,2	23,6
PP140	F	Juv	140	17	alive	NA	NA	114,7	657,9	0,0	30,4
PP141	F	Ad	260	16	alive	NA	NA	0,0	19,4	0,0	4262,6
PP142	M	Ad	285	20,5	alive	NA	NA	20,5	126,8	0,0	146,7
PP143	M	Ad	270	20,5	alive	NA	NA	0,5	444,9	0,0	12,4
PP144	M	Ad	375	20,5	alive	NA	NA	3,6	1894,8	11,3	25,8
PP145	M	Ad	175	16,5	alive	NA	NA	1,5	91,9	0,0	1273,6
PP146	F	Ad	280	19,5	alive	NA	NA	2,6	500,9	1,6	16,5
PP147	F	Ad	295	18	alive	NA	NA	36,3	1607,1	4,4	841,5
PP148	M	Ad	405	21	alive	NA	NA	33,8	84,6	0,0	33,7
PP149	M	Ad	185	18	alive	NA	NA	19,7	303,5	0,0	1708,0
PP150	M	Ad	400	21,5	alive	NA	NA	14,9	1190,3	16,0	548,3
PP151	M	Ad	325	21	alive	NA	NA	3,8	417,4	0,0	33,3
PP152	M	Ad	425	24	alive	NA	NA	28,7	19,1	0,0	542,6
PP153	F	Ad	195	16,5	alive	NA	NA	15,4	650,1	7,7	20,7
PP154	M	Ad	445	24	alive	NA	NA	5,9	1457,3	4,3	14,2
PP155	M	Ad	475	24,5	alive	NA	NA	10,5	7,0	0,0	84,1
P1	M	Ad	195	20,5	alive	R	N	7,0	38,9	0,0	9,1
P2	F	Ad	285	22,3	alive	R	N	52,9	11,8	0,0	679,7
P3	M	Ad	362	24,1	alive	R	N	14,5	1,7	0,0	40,5
P4	F	Ad	322	22,5	alive	R	N	24,4	188,8	0,0	39,6
P5	F	Juv	90,5	14	alive	R	N	11,9	4,8	0,0	793,0
P6	F	Ad	291	21,7	alive	R	N	23,7	81,7	0,0	15,6
P7	M	Juv	93,5	13	alive	R	N	3,1	0,5	0,0	19,7
P8	F	Ad	174,3	18,3	alive	R	N	65,6	3,8	0,0	113,0
P9	F	Juv	84	15,7	alive	R	N	161,9	243,3	2,7	2509,3
P10	M	Ad	272	21,6	dead	R	N	25,6	2,1	0,0	50,8
P11	F	Ad	339,5	23,4	alive	R	N	41,6	9,8	0,0	895,5

<b>P12</b>	F	Bb	69	14,7	dead	R	N	11,3	0,0	0,0	56,5
<b>P13</b>	F	Ad	311	22,8	alive	R	N	36,4	11,7	0,0	387,9
<b>P14</b>	F	Ad	264,6	22,3	alive	R	N	25,3	92,0	0,0	39,2
<b>P15</b>	M	Juv	105	15	dead	R	Yes	114,3	0,0	20,3	7437,3
<b>P16</b>	F	Ad	155	18	dead	R	Yes	67,0	0,0	18,2	16504,9
<b>P17</b>	M	Ad	205	19	dead	R	Yes	19,6	0,0	11,5	7748,3
<b>P18</b>	F	Juv	70	12,5	dead	R	Yes	15,2	0,0	13,3	12691,5
<b>P19</b>	N A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>P20</b>	F	Ad	410	23,5	dead	R	Yes	202,5	20,6	12,4	26912,1
<b>P21</b>	F	Ad	345	22	dead	R	Yes	40,1	18,8	17,3	24331,7
<b>P22</b>	M	Ad	390	24	dead	R	Yes	21,1	100,8	16,2	26261,2
<b>P23</b>	M	Ad	250	21,5	dead	R	Yes	32,1	2,8	12,2	10795,5
<b>P24</b>	F	Juv	100	15	dead	R	Yes	59,9	0,0	8,9	8945,7
<b>P25</b>	F	Ad	320	20,5	dead	R	Yes	50,5	102,9	18,5	44365,4
<b>P26</b>	M	Juv	105	15	dead	R	Yes	33,9	0,0	12,8	17948,3
<b>P27</b>	F	Juv	100	14,5	dead	R	Yes	58,8	0,0	7,7	12452,2
<b>P28</b>	F	Juv	150	19	dead	R	Yes	24,2	0,0	16,0	14103,0
<b>P29</b>	M	Juv	40	10	dead	R	Yes	4,2	0,0	7,9	7290,1
<b>P30</b>	F	Ad	200	21	dead	R	Yes	16,8	0,0	9,0	11055,9
<b>P31</b>	M	Juv	75	14	dead	R	Yes	0,0	0,0	17,0	79,7
<b>P32</b>	M	Ad	180	19	dead	R	Yes	12,6	0,0	10,3	15084,8
<b>P33</b>	F	Ad	425	25,5	dead	R	Yes	30,5	0,0	20,3	69597,8
<b>P34</b>	M	Ad	385	24,5	dead	R	Yes	22,5	44,6	9,6	15666,5
<b>P35</b>	M	Ad	285	23	dead	R	Yes	42,3	0,0	9,7	18527,8
<b>P36</b>	F	Ad	340	24	alive	R	N	93,8	111,8	13,0	217,3
<b>P37</b>	M	Ad	290	23,5	alive	R	N	36,2	0,0	0,0	30,3
<b>P38</b>	M	Ad	250	22	alive	R	N	9,1	0,0	0,0	968,0
<b>P39</b>	M	Ad	285	22	alive	R	N	21,4	0,0	0,0	34,8
<b>p40</b>	M	Juv	70	14,5	alive	R	N	5,4	0,0	0,0	406,2
<b>p41</b>	M	Juv	45	13	alive	R	N	23,5	0,0	0,0	78,4
<b>p42</b>	F	Ad	235	20,5	alive	R	N	56,9	5,9	0,0	164,1

<b>p43</b>	M	Ad	310	23	alive	R	N	25,8	1,8	0,0	107,4
<b>p44</b>	M	Ad	315	22	alive	R	N	17,3	0,0	0,0	1147,6
<b>p45</b>	F	Bb	50	13,5	alive	R	N	12,5	0,0	0,0	78,2
<b>p46</b>	F	Ad	140	16	alive	R	N	8,7	0,0	0,0	60,0
<b>p47</b>	F	Ad	110	15	alive	R	N	14,4	0,0	0,0	55,2
<b>p48</b>	F	Ad	105	16	alive	R	N	23,4	0,0	0,0	486,3
<b>p49</b>	F	Ad	160	17	alive	R	N	11,5	0,0	0,0	55,3
<b>p50</b>	F	Ad	185	18,5	alive	R	N	10,9	0,0	0,0	447,2
<b>p51</b>	F	Ad	275	20,5	alive	R	N	10,8	0,0	0,0	51,1
<b>p52</b>	F	Bb	55	11	alive	R	N	5,1	0,0	0,0	55,6

## ANNEXE 4: Protocole d'extraction

### Protocole d'extraction des AVKs dans les petits rongeurs pour analyse quantitative par LC-MS/MS

Projet terrain : résistance-leptospirose (04-06.2012)/PPradel (07.2012)

**Matrice :** foie

**Liste des AVKs :**

- Coumafène (sigma aldrich:45706 lot:SZB8200XV)
- Coumatétralyl (sigma aldrich:45404 lot:3268X)
- Chlorophacinone (Liphatech ? lot:520201) (ref. vwr : 525-0156)
- Bromadiolone (sigma aldrich:46035 lot:6061X)
- Difénacoum (sigma aldrich:32677 lot:SZB9282XV)
- Flocoumafène (sigma aldrich:34084 lot:7131X)
- Brodifacoum (sigma aldrich:46036 lot:6115X)
- Diféthialone (Liphatech ? lot:529802)

**Etalon interne (ISTD) :** dicoumarol

8AVKs : mélange des 8 AVK (ref. Phénomex : Phenex APC 3203-12)

#### 1. Solutions étalons

Une solution mère par AVK, une solution pour ISTD, soit 9 solutions mères à préparer. Stockage à -18°C dans des tubes en PP de 50 ml ( tiroir 3).

**Solutions mères :**

- Solution mère AVK 100ppm :  $10 \pm 0.1$  mg d'AVK dans 100ml de MeOH (ou  $5 \pm 0.1$  mg dans 50ml de MeOH). Concentration finale :  $100 \mu\text{g/ml}$  (100ppm)
- Solution mère ISTD à 100ppm :  $10 \pm 0.1$  mg de dicoumarol dans 100ml de chloroforme

**Solutions filles :**

- Solution fille (8AVKs) à 10 ppm (AVKs sauf BROMA) :  
100 $\mu\text{l}$  de chaque solution mère AVK + 900 $\mu\text{l}$  de MeOH

Solution fille (8AVKs) à 1 ppm (AVKs sauf BROMA) :  
100 $\mu\text{l}$  de solution fille 7AVKs à 10ppm + 900 $\mu\text{l}$  de MeOH

Solution fille (8AVKs) à 100 ppb (AVKs sauf BROMA) :  
100 $\mu\text{l}$  de solution fille 7AVKs à 1ppm + 900 $\mu\text{l}$  de MeOH

Solution fille (8AVKs) à 10 ppb (AVKs sauf BROMA) :  
100 $\mu\text{l}$  de solution fille 7AVKs à 100ppb + 900 $\mu\text{l}$  de MeOH

- Solution fille ISTD à 10 ppm :  
100 $\mu\text{l}$  de solution fille à 100ppm + 900 $\mu\text{l}$  de MeOH

Solution fille ISTD à 1 ppm :

100µl de solution fille ISTD à 10ppm + 900µl de MeOH

## 2. Extraction

**Types de matrices :** Les extractions se font dans le foie (morceau de foie découpé au ciseau ou au scalpel)

### Liste des consommables :

- Tubes en polypropylène (PP) type falcon de 50ml (ref. vwr : 525-0156)
- Acétone pour analyses (ref. sodipro CL0001172500)
- Tubes à essai (ref. vwr : 734-4225)
- Bouchons pour tube à essai (ref. vwr : 217-7003)
- Pipettes pasteur (ref. vwr : 612-1701)
- Vials (ref. vwr : 548-0028)
- Inserts à fond conique (ref. vwr : 548-0006)
- Bouchons pour vials (ref. vwr : 548-0084)
- Cônes pour pipette de 5-120µl
- Filtres de 0.2µm et seringue (ref. Phenomenex : Phenex AF0-3203-12)

### Protocole :

- Peser  $0.525 \pm 0.025$ g (soit une pesée entre 0.50 et 0.55g) de matrice. Placer dans un tube en PP de 50ml.
- Ajouter 100µl(1ppm) ISTD et 10ml acétone.
- Mouliner à l'ultra-turrax pendant env. 30s. La tige de l'ultra-turrax est démontée et rincée à l'eau chaude entre chaque spécimen, puis une fois remontée rincée dans 2 tubes PP contenant 20ml d'acétone : rinçage 1 et rinçage 2.
- Centrifuger à 3000tr/min pendant 5 min.
- Transvaser le surnageant dans un tube à essai au moyen d'une pipette pasteur.
- Evaporer à 40°C sous un léger flux d'azote.
- Reprendre dans 200µl d'ACN. Mettre un bouchon. Vortexer 10s, placer aux ultra-sons 5min, vortexer 10s.
- Placer au congélateur pendant une dizaine de minutes afin de figer la partie lipidique, et transvaser le surnageant dans un eppendorf. De la même façon, placer l'eppendorf au congélateur, puis transvaser le surnageant dans un vial+insert au moyen d'une seringue et d'un filtre de 0.2µm. Injecter 1 µl en LC-MS/MS.

**DEFRANCE Hélène**

**TITRE : Etude de la résistance aux anticoagulants chez le rat brun (*R.norvegicus*) : conséquences de l'emploi d'un rodenticide de seconde génération sur la bioaccumulation et l'évolution de la résistance. Etude dans deux fermes de Rhône-Alpes**

**Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 13 juin 2014**

**RESUME:**

Les anticoagulants ou antivitamines K sont les molécules les plus utilisées actuellement dans la lutte contre le rat brun, *Rattus norvegicus*. Les échecs de dératisation, de plus en plus fréquents, ont d'une part conduit au développement de molécules plus récentes et plus efficaces, et ont d'autre part motivé la recherche de la raison biologique de ces échecs de traitements. La notion de résistance est avancée, et sa base génétique est ensuite élucidée.

Différentes études ont montré un accroissement inquiétant de la prévalence de la résistance, via la mutation Y139F en France. Ce travail de terrain vise à mesurer l'impact d'un traitement rodenticide effectué avec les deux molécules anticoagulantes les plus récentes. Il s'agit d'évaluer la bioaccumulation de la molécule utilisée pour le traitement sur des rats piégés à court terme suite au traitement et jusqu'à huit mois post-traitement ; mais aussi d'appréhender l'évolution de la fréquence de présence de l'allèle de résistance suite à ce traitement.

**MOTS CLES :**

- Rats
- Antivitamines K
- Résistance aux pesticides
- Bioaccumulation

**JURY :**

Président :	Monsieur le Professeur Olivier Monneuse
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur Philippe Berny
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur Michel Pépin
Membre invité :	Madame Isabelle Fourel

**DATE DE SOUTENANCE : 13 juin 2014**

**ADRESSE DE L'AUTEUR :**

79 avenue du 11 novembre  
94210 La Varenne St Hilaire