



**HAL**  
open science

# Transfert de bromadiolone (appâts/sols – campagnols de prairie – renards) : Etude environnementale de la persistance et mesure indirecte de l'exposition

Mickaël Sage

## ► To cite this version:

Mickaël Sage. Transfert de bromadiolone (appâts/sols – campagnols de prairie – renards) : Etude environnementale de la persistance et mesure indirecte de l'exposition. *Ecologie, Environnement*. Université de Franche-Comté, 2008. Français. NNT: . tel-00404261

**HAL Id: tel-00404261**

**<https://theses.hal.science/tel-00404261>**

Submitted on 15 Jul 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2008

**UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE**  
U.F.R. DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
Laboratoire de Chrono-Environnement (UMR 6249 UFC/CNRS UsC INRA)

## **THESE**

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE  
Spécialité : Sciences de la vie et de l'Environnement  
Ecole doctorale 369 « Homme, Environnement, Santé »

# **Transfert de bromadiolone (appâts/sols – campagnols de prairie – renards) : Etude environnementale de la persistance et mesure indirecte de l'exposition**

par

**Mickaël SAGE**

Né le 19 avril 1981 à Besançon (Doubs)

Soutenue le 1<sup>er</sup> décembre 2008 devant le jury composé de :

<b>Pierre Mineau</b> (Professeur adjoint, Université Carleton, Ottawa, Canada)	Rapporteur
<b>Hervé Pouliquen</b> (Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes)	Rapporteur
<b>Patrick Giraudoux</b> (Professeur, Université de Franche-Comté)	Directeur de thèse
<b>Michaël Cœurassier</b> (Docteur, Université de Franche-Comté)	Co-directeur de thèse
<b>Philippe Berny</b> (Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon)	Examineur
<b>Jean-François Cosson</b> (Docteur, Directeur de recherche – INRA Montferrier)	Examineur
<b>Romain Lasseur</b> (Docteur, Directeur Recherche Développement - Liphatech)	Examineur



## Remerciements

---

Je tiens à exprimer ma plus vive reconnaissance au Pr. Patrick Giraudoux, sans qui ce travail n'aurait jamais pu être réalisé, pour l'énergie avec laquelle il a dirigé le Laboratoire de Biologie Environnementale, pour nous avoir embarqués aux côtés d'Hervé Richard pour une aventure Chrono-Environnement, mais aussi pour ses conseils et sa confiance lors de la direction de ma thèse.

J'adresse toute ma gratitude à Michaël Cœurdassier pour sa disponibilité et ses compétences, son soutien et ses conseils inestimables.

Merci au Pr. Philippe Berny pour m'avoir accueilli au laboratoire Mycotoxines et Toxicologie comparée des Xénobiotiques de L'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Merci pour ses conseils, sa confiance.

Merci à Florence Cliquet, Directrice de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments de Nancy pour m'avoir accueilli. Un grand merci à Jacques Barrat pour sa volonté, son enthousiasme et ses conseils, pour ce séjour à « Ratton plage ». A Michel Munier animalier de la station.

Tous mes remerciements vont à Brigitte Barbier, ma « maman de labo », Bernadette Videmann ma deuxième « maman de labo » et Isabelle Fourel ma troisième « maman de labo » pour m'avoir appris à déterminer « c'est quoi qui va pas dans la chaîne aujourd'hui ? » et sans qui les journées passées au coin de l'HPLC et du LC-MS auraient été (légèrement) moins distrayantes...

A Régis Defaut, Sophie Bagnoud de la Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles Franche-Comté, qui m'ont fait partager leurs connaissances de terrain, et qui étaient là, sur les parcelles, à mes côtés, y compris les jours fériés, sous la pluie glaciale du Haut Doubs, dans la neige. Que je sois là ces jours-là d'accord mais alors vous... j'ai toujours pas compris pourquoi... A moins que ce soit une envie infinie de partager vos connaissances ainsi qu'une volonté de comprendre ces histoires de mulots, ou simplement une histoire d'amitié ? Chapeau et tout plein de bonnes choses à vous... A toutes les personnes de la FREDON pour leur disponibilité lorsqu'une question me turlupinait.

A Philippe Guillemard, Denis Truchetet, Jean Ruant du Service de protection des Végétaux de Franche-Comté pour leur accueil et leurs conseils.

Je tiens aussi à remercier (très) vivement Gabriel Cordier, Président de la Zone Expérimentale de Lutte Anti Campagnols, ainsi que son épouse pour m'avoir accueilli si chaleureusement, Claude Dornier pour la communication des données météo et pour son Savoir avec un grand S.

Aux exploitants des parcelles expérimentales, aux GAEC Toubin ; GAEC Berne-Sirugue ; GAEC de la Combe, GAEC Sauge, GAEC Sancey, à Pascal Nicod, André Delavelle, aux agriculteurs de Haute pierre, du Chatelet, de Damprichard, Charquemont, Bians et Pissenavache, à tous ceux de la ZELAC, Catou, Claude, Gilbert, Patrick, François et les autres... Merci « d'y croire », j'espère que « vous y croirez encore longtemps » parce que c'est grâce à vous si « ça pourra avancer ».

A toutes ces personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement des expérimentations, Guillaume Cadier pour la collecte de fèces en nature, la Fédération départementale des Chasseurs du Doubs pour les tirs de renards, le Laboratoire Vétérinaire Départemental du Doubs (LVD25), l'Entente Rage Zoonose (ERZ Malzéville ; 54)...

Tous mes remerciements aux habitants de Pissenavache mais aussi aux promeneurs qui se sont fréquemment demandé ce que je faisais au plein milieu des champs à chaque fois qu'ils passaient dans le coin.

*« Ah, c'est pour l'histoire du produit pour les mulots... » ; « Des jalons rouges, des étiquettes jaunes... C'est technique ça... »*

*« et les planches là c'est pourquoi ? pour une barrière ? mais vont passer à coté, elle est pas assez grande »*

Merci au Marc et à l'Amélie mes collègues de bureau pour ces grandes discussions. Marc je crois qu'on se comprend très bien sur certains points (si tu vois de quoi je parle). A Amélie pour avoir apporté un peu de présence féminine dans ce monde (mais pas forcément d'ordre (oups)). Dommage que t'aies eu besoin de migrer en carto parce que sans toi on s'ennuie un peu... A Florian le saloupio, le coup des framboises avec Maryline quand j'y repense... Fred qui n'était pas réellement dans le même bureau mais c'est tout comme, faut dire il cause fort et j'étais souvent fourré chez lui, même une fois qu'Anne-Laure a été partie (comme quoi... les mauvaises langues...). A sa p'tiote famille.

A Manue pour son intégration dans le « nord » (enfin Nancy quoi...). A Franz, Martine, Skoda, Juju, Toto, Chaussette, Noel et Junior...

Au 57 43 (Claire dit la p'tiote carotte). Pour ces moments à compatir, désolé de t'avoir « en-bandonnée » pour tes derniers moments de speed mais tu vois bien... Tchou !! A l'hémoglobine non symbiotique du chêne. Merci pour ces merveilleuses pauses, ces thés froids ou « capu » concentrés, ces virées au Spar à la recherche de « l'article », la découverte de coins par vers chez toi, les visites de maisons abandonnées... pour ses bons moments passés et à venir. (Faudra quand même que tu te remettes au piano, c'est ton prof qui te parle là...)

Aux compagnons doctorants, pour le partage de notre passion mais aussi de nos doutes et nos craintes. A Olivier, on a bien rigolé quand même, pi on en a dit des « conneries ». On a quelque peu médité... mais surtout échangé sur l'Avenir. A Julie et Laurence, Colline, Sam, Greg, Laure, Bastien (dit Gérard) (ou encore l'Encadré)... A Anne-Laure pour le prêt de son mico-onde spécial thésards... A Dave pour ses connaissances en statistiques et pour cette pratique fructueuse de la langue des gens qui conduisent à gauche. Bonne chance à toute ta petite famille dans « le sud ».

Sans oublier Eve et Alex (-andre) pour m'avoir traîné dans le Vieux-Lyon. Alors ce kebab il était bon non ?

Merci à Béatrice Rebelle pour avoir su fouiner et dénicher certaines pubs, Etienne Benoît pour ses connaissances « élutionnaires » et les discussions ayant pour thème l'oreille absolue, Romain (salut la r'cherche), Alex (-andra), les deux Emilie, Marion, Julie, Alex (-andre), Agnès et John (dit jonatanne sparadra)... *« C'est quand qu'on retourne manger une glace dans le Vieux Lyon ? »* Merci aussi aux « filles du labo de tox' » Danièle tout particulièrement. Pour ces bons moments lors de mes séjours à l'ENVL.

Je souhaite aussi remercier tout le LBE devenu Chrono-Environnement, et plus particulièrement Françoise et Brigitte, Annette, Renaud, Francis, Thomas, Dom... pour « l'ambiance... » mais pas seulement. Merci à Céline, Sophie pour leurs conseils et leur motivation.

A Céline et Hervé. Faudrait quand même pas les oublier. *« Allez... plein de choses en attendant... »*. Au néné et à la nénéte (la meilleure binôme de toute la terre), à sa recherche continue de la perfection, à leur futur nénéton ou nénéttine.

A Osi et Isis, au dieu Toth pour ces super soirées à la pyramide, l'appui d'Osi en info et l'oeil averti d'Isis en ortho... Une chouette complémentarité, de quoi m'épauler sérieusement lorsqu'un problème s'est fait sentir. Merci d'avoir toujours répondu présent... c'est chouette des amis comme vous. A ces échanges fructueux sur les maisons passives. Bonne continuation dans la construction d'vot' p'tit nid.

A tous mes amis(es), copains de fac, de lycée, de collège, de primaire... et d'ailleurs. Au Guillaume, « *espèce de campagnol à la broma toi-même...* ».

A Gugus pour m'avoir accompagné quelques fois sur le terrain...

A tous mes enseignants (de « sciences nat' » (M'sieur Dulat, Jean Yves...) mais pas seulement). Merci au Pr. Jean François Viel pour son ouverture sur le monde, pour m'avoir fait rentrer dans la famille « Environnement Santé Société ». A la dernière promo du DEA ESS.

A toutes ces personnes qui ont été présentes à mes côtés lors de cette aventure, qui ont elles aussi contribué au bon déroulement de cette thèse, pour leur soutien moral. Je pense particulièrement à ma famille, à mes parents pour m'avoir soutenu. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance. A ma p'tite mémé pour avoir accepté que je n'aille pas lui rendre visite plus souvent à cause de cette histoire-là...

A Julie pour m'avoir accompagné (et supporté) ces dernières années, et pour m'avoir laissé plus que tranquille ces trois derniers mois, même s'il eût été facile de me surprendre à rêvasser. C'est un peu « grâce » à toi si j'ai « précipité » cette fin de rédaction au bénéfice d'une découverte de coins de forêt primaire, de la faune et de la flore endémique des cirques de Mafate, Cilaos et Salazie, de ton lieu de vie de ces derniers mois, des *Hapalemur aureus* et *simus* et des Zébus (un à deux litres de lait par jour, ça vaut pas les Montbéliardes, mais y'a pas les mêmes intrants dans les prairies et pâturages malagasy).

*« Le travail que nous avons pu faire est rendu possible par un monde un peu spécial. Les personnes, souvent universitaires, qui travaillent en open source travaillent dans la transparence, et la volonté de diffuser la connaissance sans contrepartie financière, donc dans un autre esprit que les "corporate" type Microsoft, ESRI, qui protègent leurs moindres secrets par 10 brevets, un secret absolu, le but ultime étant de rendre le client dépendant et de l'essorer à chacune de ses demandes... Les gens de l'open source rendent accessible à tous (étudiants, etc...) des méthodes puissantes issues des dernières avancées de la recherche. C'est aussi un réseau d'échange intense entre tool makers et tool users (ça y'en a qui en savent quelque chose...), avec respect réciproque car chacun sait ce qu'il a gagné dans la collaboration. La moindre des choses est donc de leur rendre le modeste hommage d'une citation scrupuleuse. »*

Un grand merci aux Professeurs Pierre Mineau et Hervé Pouliquen d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse ainsi qu'au Professeur Philippe Berny, aux Docteurs Jean François Cosson et Romain Lasseur d'être membre du jury. Je tiens à leur témoigner ma plus haute considération.

Cette étude a reçu le soutien financier du Conseil Général du Doubs et du Jura dans le cadre du programme d'actions contre le campagnol terrestre, du conseil Régional de Franche-Comté et de l'Institut National de Recherche Agronomique. Je souhaite très vivement les remercier.

*A Maud la taupe, Guignol le campagnol et Ratton le renardeau.*



*A Régis*

*Parce que je n'ai pas eu le temps de te dire merci  
Un grand bout de ces 5 dernières années reposent sur toi, je crois que je te dois beaucoup  
Matériellement car sans toi « j'aurais pas fait grand-chose »  
et humainement, parce que t'étais « quelqu'un »*





<b>I. INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>A. CONTEXTE GENERAL .....</b>	<b>3</b>
1. <i>Les substances chimiques – enjeux socio-économiques et environnementaux .....</i>	<i>3</i>
2. <i>Les pesticides – définition réglementaire.....</i>	<i>6</i>
3. <i>Conséquences liées à leur utilisation .....</i>	<i>6</i>
3.1 Des impacts démontrés sur les espèces non-cibles.....	6
3.2 ... une contamination diffuse.....	7
3.3 ... et des conséquences non maîtrisées sur les populations cibles .....	8
3.4 Vers une diminution progressive des quantités.....	8
<b>B. LES PROCESSUS DE TRANSFERT DES PESTICIDES DANS LES ECOSYSTEMES .....</b>	<b>9</b>
1. <i>Devenir et transport des pesticides dans l'environnement .....</i>	<i>9</i>
2. <i>Circulation et transfert des pesticides à travers les réseaux trophiques.....</i>	<i>10</i>
2.1 Exposition, biodisponibilité et bioaccessibilité .....	10
2.2 Impacts des pesticides sur les écosystèmes.....	12
2.3 Un manque de connaissances pour les écosystèmes terrestres.....	14
3. <i>Méthodes de diagnostic des contaminations et des impacts.....</i>	<i>15</i>
3.1 Observer et surveiller.....	15
3.1.1 Méthodes physico-chimiques.....	15
3.1.2 Approches biologiques.....	16
3.1.3 Réseaux de surveillance .....	17
3.2 Modéliser .....	17
3.2.1 De l'environnement à l'organisme - Processus toxicocinétique.....	17
3.2.2 Modélisation du transfert entre les niveaux trophiques .....	19
3.3 Comprendre et prévoir les effets sur les écosystèmes.....	20
3.3.1 En laboratoire.....	20
3.3.2 In situ.....	21
4. <i>Un manque de connaissance sur ces processus .....</i>	<i>21</i>

C.	MODELE D'ETUDE : LE TRANSFERT D'UN ANTICOAGULANT RODENTICIDE, LA BROMADIOLONE, A TRAVERS LES RESEAUX TROPHIQUES LORS DE SON UTILISATION POUR CONTROLER LES POPULATIONS DE CAMPAGNOL TERRESTRE <i>ARVICOLA TERRESTRIS</i> .....	23
1.	<i>Les anticoagulants rodenticides</i> .....	23
1.1	... nécessaires pour lutter contre les rongeurs.....	24
1.2	... mais toxiques pour d'autres espèces.....	24
2.	<i>L'exemple de la bromadiolone</i> .....	26
2.1	Enjeux socio-économiques et environnementaux des pullulations de campagnols de prairie et de leur contrôle.....	26
2.2	Modalités d'application .....	29
3.	<i>Comportement dans les écosystèmes</i> .....	31
3.1	Classification des molécules anticoagulants rodenticides.....	31
3.2	Propriétés physiques et chimiques de la bromadiolone .....	34
3.3	Méthodes analytiques.....	35
3.4	Persistance et comportement dans l'environnement.....	36
3.4.1	Dans l'air .....	36
3.4.2	Dans les sols.....	36
3.4.3	Dans l'eau .....	37
3.4.4	Dans les appâts .....	37
3.5	Cinétique et métabolisme .....	38
3.5.1	Absorption et distribution.....	38
3.5.2	Elimination et biotransformation.....	39
3.5.3	Excrétion .....	40
3.5.4	Persistance dans les tissus.....	41
3.6	Mécanisme d'action .....	41
3.6.1	Rappel sur l'hémostase.....	42
3.6.2	Cycle de la vitamine K et action des anticoagulants.....	44
3.6.3	Traitement antidotique .....	45
3.7	Toxicité de la bromadiolone.....	46
3.7.1	Sensibilité de différentes espèces .....	46
3.7.2	Une toxicité accrue par ingestion répétée.....	47
4.	<i>Méthodes actuelles d'évaluation du transfert de la bromadiolone à travers les réseaux trophiques</i> .....	47
4.1	Etudes de toxicité en captivité .....	47
4.2	Modélisation du transfert .....	48
4.3	Evaluation de l'exposition en nature - vers une utilisation de « marqueurs indirects »...	49
5.	<i>En résumé</i> .....	51
D.	DEFINITION DES OBJECTIFS.....	53
1.	<i>AXE 1 : Persistence de la bromadiolone dans les appâts in situ</i> .....	53
2.	<i>AXE 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement</i>	53
3.	<i>AXE 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?</i> .....	54
4.	<i>Organisation du mémoire</i> .....	55

## II. AXE 1: PERSISTANCE DE LA BROMADIOLONE DANS LES APPATS *IN SITU* .....57

A. HOW ENVIRONMENT AND VOLE BEHAVIOUR MAY IMPACT RODENTICIDE BROMADIOLONE PERSISTENCE IN WHEAT BAITS AFTER FIELD CONTROLS OF <i>ARVICOLA TERRESTRIS</i> ? .....	59
1. Summary .....	60
2. Introduction .....	61
3. Materials and methods .....	62
3.1 Study site .....	62
3.2 Bait distribution and sampling .....	63
3.2.1 Gallery treatment method .....	64
3.2.2 Storage cavity treatment method .....	64
3.3 Climatic and soil conditions .....	64
3.4 Bromadiolone analysis .....	64
3.4.1 Extraction .....	65
3.4.2 Determination of bromadiolone concentration .....	65
3.5 Survey of physical state of baits during the experiment .....	66
3.6 Statistics .....	66
4. Results .....	67
4.1 Climatic and soil conditions .....	67
4.2 Physical state of baits during the experiment .....	68
4.3 Persistence of bromadiolone in baits .....	69
4.4 Contribution of different processes to bromadiolone disappearance in baits .....	69
5. Discussion .....	71
5.1 Processes and factors influencing persistence of bromadiolone in wheat baits .....	73
6. Conclusion .....	74
7. Acknowledgements .....	75
8. References .....	75
9. En Bref .....	79

<b>III. AXE 2: CINETIQUE D'INTOXICATION DES POPULATIONS DE RONGEURS APRES UN TRAITEMENT.....</b>	<b>81</b>
<b>A. KINETICS OF BROMADIOLONE IN RODENT POPULATIONS AND IMPLICATIONS FOR PREDATORS AFTER FIELD CONTROL OF THE WATER VOLE, <i>ARVICOLA TERRESTRIS</i> .....</b>	<b>83</b>
1. <i>Summary</i> .....	84
2. <i>Introduction</i> .....	85
3. <i>Materials and methods</i> .....	87
3.1 Study site .....	87
3.2 Rodent sampling .....	87
3.3 Tissue processing and bromadiolone titration .....	88
3.4 Statistical analysis .....	89
4. <i>Results</i> .....	91
4.1 Rodent sampling and population density estimation .....	91
4.2 Kinetics of bromadiolone residues in rodent populations .....	91
4.3 Bromadiolone distribution in rodent tissues .....	96
5. <i>Discussion</i> .....	98
5.1 Rodent intoxication kinetic pattern.....	98
5.2 Ecological reality of modeling .....	99
5.3 Long time persistence of bromadiolone residues .....	100
5.4 Bromadiolone distribution in tissues .....	101
5.5 Implications for predator exposure .....	101
6. <i>Conclusion</i> .....	104
7. <i>Acknowledgements</i> .....	104
8. <i>References</i> .....	105
9. <i>En Bref</i> .....	110
<b>B. VARIATION TEMPORELLE DE L'INTOXICATION D'UNE POPULATION DE CAMPAGNOLS TERRESTRES – CAS DE LA RECOLONISATION DE TERRIERS TRAITES.....</b>	<b>111</b>
1. <i>Introduction</i> .....	111
2. <i>Matériel et méthodes</i> .....	112
2.1 Site d'étude.....	112
2.2 Réintroduction de campagnols non intoxiqués dans les terriers traités .....	112
2.3 Capture des individus réintroduits .....	113
2.4 Préparation des échantillons et dosage de la bromadiolone.....	114
2.5 Analyses statistiques .....	114
3. <i>Résultats</i> .....	115

3.1	Piégeage des terriers avant chaque campagne de réintroduction .....	115
3.2	Capture des individus après leur réintroduction dans les terriers traités.....	117
3.3	Distribution de la bromadiolone dans les tissus .....	118
4.	<i>Discussion</i> .....	119
4.1	Individus capturés avant les campagnes de réintroduction .....	119
4.2	Individus réintroduits dans les terriers .....	120
4.3	Distribution de la bromadiolone entre tissus analysés .....	121
4.4	Taux de recapture.....	121
4.5	Implication pour l'exposition des prédateurs .....	122
5.	<i>En bref</i> .....	123

#### **IV. AXE 3: COMMENT MESURER L'EXPOSITION DES POPULATIONS DE RENARD ?..... 125**

A.	DETECTION OF BROMADIOLONE RESIDUES IN FOX FAECES BY AN LC/ESI-MS ANALYTICAL METHOD IN RELATIONSHIP WITH TOXICOLOGICAL DATA AND CLINICAL SIGNS AFTER INTOXICATION .....	127
1.	<i>Summary</i> .....	128
2.	<i>Introduction</i> .....	129
3.	<i>Materials and methods</i> .....	131
3.1	Fox exposure .....	131
3.2	Sampling .....	132
3.3	Bromadiolone titration in faeces and plasma.....	132
3.4	Bromadiolone titration in liver .....	135
3.5	Blood-clotting test .....	135
3.6	Therapeutic protocol .....	135
3.7	Statistics.....	136
4.	<i>Results and discussion</i> .....	137
4.1	Validation of the bromadiolone method titration in faeces and plasma .....	137
4.2	Fox feeding phase .....	138
4.3	Kinetics of bromadiolone residues in faeces .....	139
4.4	Toxicological data and fox health conditions .....	142
4.4.1	Kinetics of bromadiolone in plasma .....	142
4.4.2	Reference values of Blood-clotting test .....	143
4.4.3	Relationships between PT kinetics and intoxication clinical signs.....	144
4.4.4	Bromadiolone concentrations in liver .....	145
4.4.5	Implication of toxicity data on risk assessment.....	146
4.5	Relationship between bromadiolone residues in faeces, toxicological data and clinical signs .....	147
5.	<i>Acknowledgements</i> .....	149
6.	<i>References</i> .....	149
7.	<i>En bref</i> .....	154

B.	EVALUATION DE L'EXPOSITION DES PREDATEURS PAR LA COLLECTE DE FECES ET LEUR DOSAGE EN BROMADOLONE – ETUDE DE FAISABILITE EN NATURE .....	155
1.	<i>Etude 1 : Collecte et analyse de fèces de renard en nature</i> .....	155
1.1	Matériel et méthodes.....	155
1.1.1	Site d'étude .....	155
1.1.2	Collecte de fèces.....	156
1.1.3	Analyse de la bromadiolone.....	157
1.1.4	Analyses statistiques.....	158
1.2	Résultats .....	158
1.3	Discussion.....	159
1.3.1	Collecte des fèces .....	159
1.3.2	Résidus de bromadiolone dans les fèces .....	160
1.4	Conclusion .....	160
1.5	En Bref .....	161
2.	<i>Etude 2 : Comparaison des résidus de bromadiolone dans le foie et le contenu rectal de renards prélevés in situ</i> .....	162
2.1	Matériel et méthode .....	162
2.1.1	Site d'étude et échantillonnage .....	162
2.1.2	Dosage de la bromadiolone .....	163
2.1.3	Analyses statistiques.....	163
2.2	Résultats .....	163
2.2.1	Résidus de bromadiolone mesurés dans le foie .....	163
2.2.2	Résidus de bromadiolone mesurés dans le contenu rectal .....	164
2.2.3	Relations entre résidus hépatiques et résidus mesurés dans les contenus rectaux ..	165
2.3	Discussion.....	166
2.3.1	Résidus de bromadiolone mesurés dans le foie .....	166
2.3.2	Résidus de bromadiolone mesurés dans le contenu rectal .....	168
2.3.3	Relation entre résidus hépatiques et concentrations mesurées dans les contenus rectaux ..	169
2.4	Conclusion .....	169
2.5	En bref .....	170
<b>V.</b>	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>171</b>
A.	VARIABILITE ENVIRONNEMENTALE DE LA PERSISTANCE DE LA BROMADIOLONE ENTRE LES NIVEAUX TROPHIQUES APPATS/SOLS – POPULATIONS DE CAMPAGNOLS DE PRAIRIE .....	173
B.	MESURE INDIRECTE DE L'EXPOSITION DES POPULATIONS DE RENARDS .....	175
C.	PERSPECTIVES.....	177
1.	<i>Poursuite de la validation de la méthode de mesure de l'exposition des populations de renards</i> .....	177
2.	<i>Pour une compréhension plus fine des processus de transfert</i> .....	178
D.	CONCLUSION.....	182
<b>VI.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>187</b>

## Liste des tables

---

<b>Table 1.</b> Propriétés physicochimiques de la bromadiolone (D'après AGRITOX INRA, 2007 ; WHO, 1995).....	34
<b>Table 2.</b> Données de toxicité aigüe en ingestion unique de la bromadiolone administrée par voie orale disponibles dans la littérature pour les vertébrés terrestres.....	46
<b>Table 3.</b> Comparaison entre les données de toxicité aigüe par ingestion unique et celles par ingestion répétée pendant 5 jours pour le chien et le rat.....	47
<b>Table 4.</b> Topographic characteristics and physicochemical properties of the three soils.....	63
<b>Table 5.</b> Climatic and pedo-climatic conditions at study site and in EC respectively for the two seasons .....	67
<b>Table 6.</b> Parameter values $C_0$ , $\beta$ and $\alpha$ determined in artificial galleries and storage cavities; R2 and half-lives (DT50 in days) in autumn and in spring from the distributed loss model (Gustafson and Holden 1990) .....	70
<b>Table 7.</b> Estimates of kinetic parameters for bromadiolone persistence in the water vole population trapped underground after a field treatment. Parameters are presented for the whole body (Whole b.) and each tissue: liver, carcass, and digestive tract (D.t.), with the rate constant $k_0$ being estimated in treatment galleries and in storage cavities.....	93
<b>Table 8.</b> Estimates of kinetic parameters for bromadiolone persistence in common vole and water vole populations trapped aboveground after a field treatment. Parameters are presented for the whole body (Whole b.) and each tissue: liver, carcass, and digestive tract (D.t.) with the rate constant $k_0$ being estimated in treatment galleries and in storage cavities.....	95
<b>Table 9.</b> Tableau récapitulatif des captures de Campagnols terrestres (AT), Campagnols de champs (MA) et Taupes (TE) avant et après les trois campagnes de réintroduction. Chacune des proportions calculées a été exprimée en pourcentage et son intervalle de confiance IC95% est précisé. ....	1
<b>Table 10.</b> Estimates of kinetic parameters for bromadiolone elimination kinetics in plasma and faeces for each fox. ....	139
<b>Table 11.</b> Different possibilities of fox health conditions observed in fonction of bromadiolone concentration and quantity measured in faeces.....	148
<b>Table 12.</b> Détail des fèces collectées sur le terrain le long de transects (a) et sur les crottoirs (b). ..	158





## Liste des Figures

---

- Figure 1.** Schéma d'exposition des organismes aux pesticides..... 11
- Figure 2.** Principaux types de pyramide des concentrations de polluants selon la valeur du facteur de transfert dans les réseaux trophiques : sont ici comparées les pyramides des biomasses avec celles des concentrations selon la valeur du facteur de transfert. A :  $F_t = 1$  (simple transfert) ; B :  $F_t < 1$  (décroissance) ; C :  $F_t > 1$  (bioamplification) (d'après Ramade 2007). ..... 12
- Figure 3.** Chronologie théorique des effets induits par l'introduction d'un pesticide dans le milieu naturel (d'après Caquet et Lagadic, 1998) Le signal recherché (substance chimique, biomarqueur ou bioindicateur) sera défini dans le paragraphe I.B.3.1.2 p. 14 ..... 13
- Figure 4.** Représentation schématique d'un modèle toxicocinétique à un compartiment avec l'absorption du pesticide (a), sa biotransformation (b) et son élimination (e). ..... 18
- Figure 5.** Courbes montrant la concentration d'exposition suite à une contamination ponctuelle de l'environnement à  $C_0$  (a), la quantité absorbée dans le corps de l'organisme (b), le risque encouru par les organismes présents dans le milieu (c) et le taux de survie des organismes (d) (d'après Widianarko et Van Straalen, 1996). ..... 19
- Figure 6.** Diffusion spatiale des pullulations d'*Arvicola terrestris* dans le département du Doubs (Franche-Comté, France) entre 1989 et 1995, soit la durée d'un cycle (d'après Giraudoux et al., 1997). ..... 27
- Figure 7.** Photographie d'une parcelle lors d'un pic de pullulation – La Vrigne (25), Décembre 2006 .. 28
- Figure 8.** Photographie d'une charrue sous-solleuse (à gauche) et d'une parcelle après traitement (à droite). ..... 31
- Figure 9.** Structure semi-développée de la vitamine K époxyde (1) et des trois familles d'anticoagulants utilisés actuellement pour la lutte contre les rongeurs : hydroxy-4 coumarine (2), hydroxy-4 benzothiopyranone (3) et Indane-dione (4). ..... 32
- Figure 10.** Structure semi-développée de la bromadiolone – C\* : carbone asymétrique (WHO, 1995). ..... 35
- Figure 11.** Représentation théorique des cinétiques plasmatiques et hépatiques des rodenticides anticoagulants chez le chien (Huguet, 1998). ..... 40
- Figure 12.** Schéma global récapitulatif de la cascade d'activation des facteurs de la coagulation permettant l'hémostase secondaire. Les voies extrinsèques et intrinsèques, empruntées pour la mise en place du mécanisme commun de l'hémostase, sont ici distinguées. Les facteurs activés sont symbolisés par le numéro du facteur suivi de la lettre a (Vermeer, 1984) ..... 43
- Figure 13.** Cycle de la vitamine K montrant la réaction de carboxylation couplée à l'oxydation de la vitamine K pour l'activation de l'acide glutamique terminal des facteurs de coagulation vitamine K dépendants (Le Bonniec, 2004). L'action des anticoagulants à travers l'inhibition de la VKOR époxyde réductase est symbolisée par une flèche..... 45

- Figure 14.** Number of wheat grains by gram of baits (mean  $\pm$  S.D.) in artificial galleries (n=6) and storage cavities (n=2) as a function of time for the two seasons. Data of galleries were pooled for the 3 soils..... 68
- Figure 15.** Percentage of dry mass in baits versus fresh mass (mean  $\pm$  S.D.) in artificial galleries (n=6) and storage cavities (n=2) in spring as a function of time. Data of galleries were pooled for the 3 soils..... 69
- Figure 16.** Bromadiolone concentration decrease in baits in autumn ( a ) and in spring ( b ) (artificial galleries: Eutric cambisol; Gleyic cambisol; Luvisol - Storage cavities in Eutric cambisol). Bromadiolone concentrations are expressed in mg kg<sup>-1</sup> fresh mass..... 71
- Figure 17.** Remaining bromadiolone (black) (%) and contribution of the dilution processes (blank) and 'true disappearance' processes (hatched) in the decrease of bromadiolone concentrations in wheat baits in time relative to the initial concentration in baits..... 72
- Figure 18.** Bromadiolone concentrations in the 96 water voles trapped underground. Dotted line: model fit under the hypothesis of voles feeding exclusively in storage, dark line: model fit under the hypothesis of voles feeding exclusively in galleries. .... 92
- Figure 19.** Bromadiolone concentration in the 69 common voles (O) and in the five water voles ( $\blacktriangle$ ) trapped aboveground. Dotted line: model fit under the hypothesis of voles feeding exclusively in storage, dark line: model fit under the hypothesis of voles feeding exclusively in galleries..... 94
- Figure 20.** Bromadiolone concentration in the 14 common voles collected dead (O) or two moribund ( $\blacktriangle$ ) and the water vole (+) collected dead aboveground..... 96
- Figure 21.** Bromadiolone quantity in the liver, carcass, and digestive tract of rodents presenting detectable residues: water vole trapped underground (1); common voles trapped aboveground (2) and collected dead (3). For each boxplot, the median and inter-quartile range are indicated by the horizontal line and box height, respectively. Letters a and b indicate difference between tissues for a same category (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). .... 96
- Figure 22.** Evolution of the bromadiolone distribution in tissues over time in the water vole population. .... 97
- Figure 23.** Concentration en bromadiolone (médiane et quartiles) dans le foie, la carcasse et le tube digestif des campagnols capturés avant la réintroduction (Av) ou réintroduits 1,5 ; 3 et 6 mois après le traitement. .... 118
- Figure 24.** Pourcentage de bromadiolone (médiane et quartiles) contenue dans chacun des tissus par rapport à la quantité totale contenue dans tout le corps des individus positifs piégés avant réintroduction (1), et de ceux réintroduits (2). Une lettre identique entre tissus d'une même modalité indique une absence de différence entre ces tissus (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Un astérisque indique une différence pour un même tissu entre les modalités 1 & 2 (Mann et Whitney,  $p < 0,05$ )..... 119
- Figure 25.** Chromatogram and mass spectrum for a blank faeces sample spiked at the LOD 0.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . (a) representing the bromadiolone peak and (b) the IS..... 138
- Figure 26.** Graphic representing measures on foxes feeding on five water voles spiked with 200 $\mu\text{g}$  of bromadiolone/vole during two (F2) or five days (F5.1, F5.2, F5.3) and control (F0). Each point is the measure for each fox at one time for bromadiolone concentration in faeces (a) and

bromadiolone concentration in plasma (b). Dotted lines are the expected curves as fitted by the computer with the one-compartment model derived from Widianarko and Van Straalen (1996).  
..... 140

**Figure 27.** Graphic representing measures on foxes feeding on five water voles spiked with 200µg of bromadiolone/vole during two (F2) or five days (F5.1, F5.2, F5.3) and control (F0). Each point is the measure for each fox at one time for bromadiolone quantity in faeces (a), and values for each fox represent the mean of two measurements of Protrombin Time (b). Unbroken lines connect points only to facilitate reading. Vitamin K1 administration is represented by the two arrows... 141

**Figure 28.** Carte de situation de la zone d'étude. Chaque x symbolise l'emplacement d'un crottoir. Les transects effectués sur les chemins de remembrement sont symbolisés en bleu. Les zones de forêts sont figurées en vert. Les parcelles traitées à la bromadiolone entre le 1er et le 15 avril sont illustrées en rouge. Les terriers de renards qui ont pu être repérés sont représentés par un O. .... 156

**Figure 29.** Concentration en bromadiolone (médiane et quartiles) dans les fèces de renard présentant des résidus quantifiables et récoltées sur le terrain entre 15 jours et 45 jours après les traitements. Echelle logarithmique – Résultats exprimés en µg de bromadiolone par kg de matière sèche. .... 159

**Figure 30.** Concentration en bromadiolone (médiane et quartiles) dans les foies de renard prélevés sur le terrain lors de tirs de nuit présentant des résidus de bromadiolone détectables. .... 164

**Figure 31.** Concentration en bromadiolone (médiane et quartiles) dans les contenus rectaux de renard prélevés sur le terrain lors de tirs de nuit. Echelle logarithmique – Résultats exprimés en µg de bromadiolone par kg de matière sèche. .... 165

**Figure 32.** Relation exponentielle entre les concentrations en bromadiolone mesurées dans les fèces (marqueur d'exposition indirect) et dans le foie (marqueur d'exposition direct) des renards. Par souci de lisibilité, un individu présentant des concentrations supérieures (2,5 mg.kg-1 dans le foie et 577,7 µg.kg-1 dans le contenu rectal) n'a pas été représenté sur ce graphique. .... 166

**Figure 33.** Concentrations en bromadiolone (valeurs médiane, minimum et maximum) mesurées dans les foies des renards prélevés en tir de nuit, n=48 (a), des renards intoxiqués en captivité (Paragraphe IV.A.4.4.4 p.137), n=4 (b) et de renards retrouvés morts sur le terrain à la suite de traitements à la bromadiolone, n=31 (c). .... 167

**Figure 34.** Schéma synthétisant les facteurs environnementaux pouvant moduler le transfert de la bromadiolone dans la chaîne alimentaire « appâts/sols - campagnols de prairie - renard ». Les paramètres pour lesquels un élément de réponse a été apporté par nos travaux sont présentés dans un cadre. Chaque flèche représente proportionnellement à sa taille l'influence que chacun des facteurs exerce sur un autre. .... 174

**Figure 35.** Schéma représentant un modèle du système envisagé, l'approche proposée et les résultats attendus (d'après Cœurdaissier et al. 2005). .... 184



## Principales publications écrites et orales

---

### Articles scientifiques - revues indexées au Journal Citation Report (JCR) de l'international Scientific Index (ISI)

Sage M., Coeurdassier M., Defaut R., Lucot E., Barbier B., Rieffel D., Berny P., Giraudoux P. (2007) *How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of Arvicola terrestris?* Environmental Pollution. 148. 372-379

Sage M., Coeurdassier M., Defaut R., Berny P., Giraudoux P. *Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of Arvicola terrestris.* Science of the Total Environment. 407. 211-222

Sage M., Fourel I., Coeurdassier M., Barrat J., Berny P., Giraudoux P. *Non invasive method to monitor fox exposure to bromadiolone – detection of residues in faeces by LC/ESI-MS and relationship with direct markers.* Environmental Research. Soumis

Sage M., Coeurdassier M., Defaut R., Berny P., Giraudoux P. *Temporal variation of a Water vole population exposure to bromadiolone baits and implication for predators – Case of the recolonisation of a treated parcel.* Journal of Applied Ecology. En préparation

Sage M., Coeurdassier M., Fourel I., Cadier G., Berny P., Giraudoux P. *Assessment of fox exposure to bromadiolone based on faeces sampling and molecule determination with LC/ESI-MS method – feasibility study in the field.* En préparation

### Chapitre de livre

Coeurdassier M., Sage M., Defaut R., Berny P., Giraudoux P. *Transfert de la bromadiolone dans les chaînes alimentaires en nature.* In : La lutte raisonnée contre le Campagnol terrestre – Enjeux et perspectives. Delattre, Giraudoux & Garel editors. INRA édition. A paraître

### Communications orales

#### Congrès internationaux

Sage M., Coeurdassier M., Fourel I., Barrat J., Berny P., Giraudoux P. *Non-Invasive method to monitor wildlife exposure to bromadiolone.* 234<sup>th</sup> National Meeting of the American Chemical Society, 19 – 23 August 2007, Boston, USA.

Sage M., Coeurdassier M., Defaut R., Bagnoud S., Berny P., Giraudoux P. *Outdoor uses of SGARs for vole control in France and resultant environmental contamination.* First International Workshop on the Environmental Impacts of Second-Generation Rodenticides, 10 November 2006, Montréal, Canada.

Sage M., Coeurdassier M., Defaut R., Bagnoud S., Berny P., Giraudoux P. *Transfer of bromadiolone in food webs: Intoxication kinetic of rodent population and predator exposure*

*after control of Arvicola terrestris*. 27th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology & Chemistry North America; 5 – 9 November 2006, Montréal, Canada.

Sage M., Coeurdassier M., Lucot E., Defaut R., Barbier B., Rieffel D., Berny P., Giraudoux P. *Persistence of bromadiolone in wheat baits: Environmental variability during and after control of Arvicola terrestris populations*. 15th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology & Chemistry Europe; 22 - 26 may 2005, Lille, France.

### Congrès nationaux

Coeurdassier M., Sage M., Defaut R., Berny P., Giraudoux P. *Transfert de la bromadiolone dans les réseaux trophiques : des appâts ... vers les campagnols ... jusqu'aux prédateurs*, 3<sup>ème</sup> séminaire d'écotoxicologie de l'INRA, 17,18 & 19 septembre 2006, Dinard, France.

Sage M., Coeurdassier M., Defaut R., Barbier B., Rieffel D., Berny P., Giraudoux P. *Persistence d'un anticoagulant rodenticide – la bromadiolone – dans une population de Campagnols terrestres (Arvicola terrestris) après une opération de contrôle*. 11<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs ; Ecoles Doctorales « Homme, Environnement, Santé » et « Science de la Vie et la Santé », 9 & 10 juin 2005, Dijon, France.

Sage M., Coeurdassier M., Lucot E., Defaut R., Barbier B., Rieffel D., Berny P., Giraudoux P. *Persistence de la bromadiolone dans les appâts grains de blé – Variabilité environnementale lors des opérations de contrôle des populations de Campagnols terrestres (Arvicola terrestris)*. 10<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs ; Ecoles Doctorales « Homme, Environnement, Santé » et « Science de la Vie et la Santé », 9 & 10 juin 2004, Besançon, France.

# **I. INTRODUCTION GENERALE**





## A. Contexte général

### 1. Les substances chimiques – enjeux socio-économiques et environnementaux

La contamination de l'environnement par un ensemble de composés chimiques anthropogéniques ou d'origine naturelle est une des préoccupations majeures des sociétés humaines en ce début de millénaire. Malgré la prise en compte de ces problèmes dans les politiques publiques et les efforts de recherche, un certain nombre de points restent à améliorer comme la préservation de la qualité des écosystèmes tout en réduisant leur contamination par les pesticides.

Ces substances chimiques offrent des avantages dont la société moderne ne saurait se passer, par exemple, pour la production alimentaire, la fabrication de médicaments, l'industrie textile, l'industrie automobile, etc. (Ramade, 2007). Elles sont considérées également comme constituant un facteur essentiel de prospérité économique en termes d'échanges commerciaux et d'emploi. La production mondiale de substances chimiques est passée d'un million de tonnes en 1930 à 400 millions de tonnes aujourd'hui (Centre de documentation Économie-Finances, 2008). Par exemple, près de 100 000 substances différentes sont enregistrées sur le marché de la Communauté Européenne (CE). En 1998, la production mondiale de produits chimiques était estimée à 1244 milliards d'euros dont 31 % à mettre à l'actif de l'industrie chimique de la CE qui était alors la première industrie chimique du monde, suivie par celle des États-Unis avec 28 % de la valeur de la production (Ramade, 2007 ; UIPP, 2005).

Quatre vingt quinze pour cent des **ressources alimentaires** mondiales reposent sur 30 espèces cultivées et 50% des apports énergétiques sont aujourd'hui fournis par les trois variétés de « méga-cultures » que sont le blé, le riz et le maïs (FAO, 2002). La plupart de ces variétés phyto-génétiques ne peuvent survivre à l'état sauvage. Les variétés à haut rendement sont beaucoup moins résistantes aux ravageurs et aux maladies cryptogamiques des plantes cultivées que les variétés autochtones dites « traditionnelles ». Dans ce contexte politique d'une agriculture intensive et productiviste, il est donc vital de protéger ces cultures. Les progrès dans la protection des plantes ont largement contribué à l'augmentation des rendements et à la régularité de la production. Faciles d'accès et d'emploi, relativement peu chers, les produits phytosanitaires de synthèse se sont révélés très efficaces et fiables dans un nombre important de cas, sur de grandes surfaces. L'agriculture française a, plus que d'autres, développé des systèmes de production fondés sur l'utilisation de ces produits. Elle apparaît actuellement très dépendante des pesticides, et fait de la France le troisième

consommateur mondial (Aubertot et al., 2005 ; Commission des Communautés Européennes, 2001 ; Ramade, 2007). Malheureusement, en dépit de tous les efforts, parasites et ravageurs détruisent chaque année entre 20 et 40% des cultures. Après la récolte, insectes, micro-organismes, rongeurs et oiseaux occasionnent une perte supplémentaire de 10 à 20% ce qui porte la destruction totale à quelques 40 ou 50 % (Riba et Silvy, 1989). Les dégâts peuvent être occasionnés sur les denrées stockées destinées à la consommation humaine et animale et sur les équipements des bâtiments. La destruction des denrées est bien souvent une action directe par consommation et indirecte par souillure des produits dûe par exemple aux poils, aux fèces et à l'urine. Le Louarn et Quéré (2003) considèrent qu'un rat rend impropre à la consommation 250 à 300 grammes de blé par jour, la destruction des emballages entraînant de nouveaux dégâts en facilitant la contamination des denrées par des champignons, des micro-organismes ou des insectes.

De plus, malgré les graves déficits alimentaires dont pâtissent de nombreuses régions du monde et une déforestation intensive au profit de l'agriculture, le développement, industriel en particulier, réduit continuellement la superficie des terres cultivées. La consommation de produits agricoles devrait continuer à augmenter sous l'effet de l'augmentation de la croissance démographique de la population et la hausse des prix alimentaires suscite de plus en plus de craintes dans les économies émergentes (OCDE/FAO, 2007). Enfin, l'agriculture pourrait bientôt évoluer sous l'effet du changement climatique (FAO, 2005), et être appelée à jouer un rôle important dans les cultures non alimentaires (bioproduits, agro/bio-carburants) ou la séquestration du carbone (OCDE/FAO, 2007).

Dans ces conditions, la lutte antiparasitaire ne cesse de croître et devra permettre une utilisation plus intensive des terres arables. Les conséquences concernant les dégâts aux récoltes sur pied ou stockées, dûes aux pullulations de ravageurs, devront être extrêmement réduites.

**Sur le plan médical,** les maladies à transmission vectorielle (MTV) sont un autre risque émergent, comme en témoigne la récente épidémie de Chikungunya à la Réunion et à Mayotte entre mars 2005 et février 2006 (WHO, 2006). Chaque année, des centaines de millions de cas de maladies transmises par des insectes, mollusques ou rongeurs se produisent, représentant une menace pour la santé publique mondiale. Les MTV telles que le paludisme, la maladie de Chagas, la dengue et sa forme hémorragique, l'onchocercose, la leishmaniose, l'échinococcose etc. représentent environ 17 % de la totalité des maladies infectieuses recensées (FAO, 2005) et font obstacle au développement économique et social de millions de gens (WHO, 2003). La mondialisation et les changements planétaires favorisent leur extension et en l'espace de deux décennies, nous avons assisté à la

réémergence ou à la propagation à de nouvelles zones de nombreuses de ces MTV. De ce fait, la lutte antivectorielle est une des priorités de santé publique majeure dans la prévention de la transmission de ces maladies (Townson et al., 2005).

Parallèlement, les rongeurs sont des hôtes (réservoirs) pour de nombreux virus, bactéries ou parasites (Delattre et al., 1998). Du fait de leur habitat, les rongeurs anthropophiles (Rat surmulot, Rat noir et Souris domestique) entretiennent avec l'espèce humaine des contacts étroits et sont à l'origine de bien des maladies qui concernent aussi bien les citadins (égoutiers, éboueurs etc.) que les ruraux (agriculteurs etc.). Les populations de rongeurs forestiers (genre *Apodemus* et *Clethrionomys*) ou de prairies (genre *Microtus* et *Arvicola*) peuvent quant à elles présenter d'importantes fluctuations pluriannuelles d'abondance. En se traduisant certaines années par de véritables pullulations, surtout chez les campagnols de prairie, elles augmentent donc les possibilités de contact avec l'Homme. Différents modes de contamination sont possibles notamment par morsure mais aussi ingestion de l'agent pathogène disséminé dans l'environnement ou alors par l'intermédiaire d'un vecteur comme désigné ci-dessus, en général arthropode. Parmi ces maladies potentiellement mortelles chez l'Homme, nous pouvons citer la peste, la maladie de Lyme, la leptospirose, les salmonelloses ou encore la fièvre hémorragique à syndrome rénal et l'échinococcose.

Utilisés à bon escient, les pesticides jouent donc un rôle extrêmement important dans la lutte contre ces maladies et leur prévention et la lutte chimique est l'élément le plus important d'une stratégie intégrée de lutte contre ces réservoirs ou vecteurs qui menacent la santé publique (WHO, 2003 ; 2006).

Outre leur importance croissante dans la production des ressources alimentaires et leur nécessité en matière de santé publique et de lutte contre la transmission de maladies, l'ensemble de ces substances chimiques qui éliminent les organismes dits nuisibles, communément appelées « pesticides », peuvent être utilisées dans d'autres applications. Il peut s'agir notamment de la conservation du bois, la désinfection ou la lutte anti-parasitaire, pour détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, en prévenir l'action ou les combattre de toute autre manière. Malheureusement, ces substances sont souvent aussi néfastes pour des organismes non-cibles et ont des effets sur la santé humaine et l'environnement.

### 2. Les pesticides – définition réglementaire

Le terme "**pesticides**" dérivé du mot anglais pest (« ravageurs ») et du suffixe « cide » provenant du latin *caedere* signifiant « tuer », est une appellation générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications.

D'un point de vue réglementaire, on distingue :

- **les produits phytopharmaceutiques** (au sens de la Directive 91/414/CE), plus communément désignés en France par le terme « **produits phytosanitaires** » : ils sont utilisés principalement pour la protection des végétaux en agriculture ou dans d'autres secteurs (sylviculture, aménagement des paysages et entretien des abords d'axes de transport, jardinage amateur).

- **les biocides** (définis dans la Directive « biocides » 98/8/CE) : ce sont des substances actives et des préparations contenant une ou plusieurs substances actives utilisées, par exemple, dans des applications comme la conservation du bois, la désinfection ou la lutte anti-parasitaire, pour détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, en prévenir l'action ou les combattre de toute autre manière par une action chimique ou biologique.

### 3. Conséquences liées à leur utilisation

#### 3.1 Des impacts démontrés sur les espèces non-cibles...

A l'échelle mondiale, l'usage des pesticides correspondait au début de la présente décennie à une consommation annuelle de plus de 3 millions de tonnes de matières actives pures (Ramade, 2007). Il s'agit au plan écotoxicologique d'une masse polluante colossale si l'on considère que certaines de ces substances possèdent une toxicité aiguë très importante et que d'autres comme les insecticides organochlorés, aujourd'hui proscrites dans les pays développés mais toujours en usage dans le reste du monde, sont d'une persistance extraordinaire et d'une toxicité à long terme redoutable (e.g. Newton et al., 1993). De plus leur mode d'action peut interagir et ainsi créer des synergies entre différentes molécules (e.g. Benachour et al., 2007). Après avoir pénétré dans les organismes, ils se répartissent

alors au sein des tissus où ils interagissent avec diverses molécules biologiques. Les interactions moléculaires se traduisent par une (ou des) variation(s) de paramètres biochimiques. Certains changements biochimiques peuvent avoir des effets physiologiques sur les individus. La prédation de ces individus contaminés par des consommateurs de niveau trophique supérieur entraîne alors la contamination de toute la chaîne alimentaire. Nous l'avons vu, les pesticides ont un impact économique et des bénéfices d'utilisation, mais il n'en reste pas moins que certains de ces produits chimiques nuisent gravement à la santé humaine et dégradent sérieusement l'environnement. Parmi les nombreux exemples bien connus, nous pouvons citer le DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane), insecticide organochloré dont l'usage intensif a entraîné dès les années 50 des troubles de la reproduction chez les oiseaux avec par exemple une régression catastrophique des colonies de Sternes caugeck (*Sterna sandwicensis*) du littoral hollandais où 50 000 couples étaient recensés en 1952 alors qu'il n'en restait plus que 150 en 1965 (Koeman et al., 1967). L'exemple très récent du chlordécone, un autre insecticide organochloré utilisé dans les bananeraies et interdit depuis 1993 dans les Antilles françaises, montre que les contaminations peuvent persister à un niveau élevé longtemps après l'interdiction d'utilisation des substances responsables, dans les eaux superficielles comme en eaux souterraines (IFEN, 2006). Enfin, l'utilisation de rodenticides permettant de contrôler les populations de rongeurs de prairie entraîne chaque année des mortalités importantes de rapaces ou mammifères prédateurs (Berny, 2007). Bien que ces substances aient fait l'objet de certaines restrictions, ces mesures sont intervenues alors que le mal était déjà fait, car les effets néfastes de ces substances ont été très peu considérées tant qu'elles n'étaient pas utilisées en grandes quantités.

### **3.2 ... une contamination diffuse...**

Le manque de connaissances concernant les effets de nombreux produits chimiques sur la santé humaine et l'environnement est une source de préoccupation. Selon le dernier rapport de l'IFEN (2006), en France, 96% des points de mesure des cours d'eau et 61% des points de mesure des eaux souterraines contiennent au moins un pesticide parmi ceux recherchés. Les niveaux de contamination sont souvent significatifs : en eaux de surface, 49% des points de mesure ont une qualité moyenne à mauvaise, et en eaux souterraines, 27% des points nécessiteraient un traitement spécifique d'élimination des pesticides s'ils étaient utilisés pour la production d'eau potable.

### **3.3 ... et des conséquences non maîtrisées sur les populations cibles**

L'utilisation répétée d'un pesticide entraîne à plus ou moins long terme une sélection d'individus résistants dans la population visée (Baerson et al., 2002 ; Coetzeen et al., 2006 ; Powles et al., 1998 ; VanGessel, 2001). Face à cette résistance des populations cibles, progressivement, les doses et les fréquences des applications ont été augmentées, menaçant notre bien-être au travers de leur impact sur l'environnement et la santé. Ce développement de résistances pourra néanmoins être réduit en limitant l'utilisation de pesticides à des situations qui en ont absolument besoin et par l'optimisation des pratiques limitant la sélection de populations résistantes. Mais dans de nombreux cas, il a été nécessaire de changer la famille chimique du pesticide utilisé. Des molécules nouvelles et encore plus toxiques ont été introduites sur le marché (Ramade, 2007).

### **3.4 Vers une diminution progressive des quantités**

Du fait de la prise de conscience de leur impact sur la santé humaine et l'environnement, dans beaucoup de pays, les pesticides ont été soumis à un contrôle strict depuis un certain temps. Une réduction de leur consommation a été initiée à la fin des années 1980, et est très significative parmi les pays développés les plus avancés en matière de protection de l'environnement. Malgré ces nombreuses inquiétudes la consommation de pesticides n'a commencé à décroître en France qu'à partir des années 1990. En 1991, cette consommation a culminé avec 92 250 t de matières actives pures. Elle avait alors crû de 20% par rapport à celle de 1980 et plus que doublé par rapport à 1975 (Ramade, 2007 ; UIPP, 2005). Cette réduction de consommation des pesticides est cependant moins apparente si l'on prend en considération non plus les quantités de matières actives utilisées en valeur absolue mais le potentiel toxicologique de ces dernières par unité de masse (Ramade, 2007). La politique actuelle a pour principal objectif d'assurer un *niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement*, à la fois pour la génération présente et pour celles à venir, tout en garantissant le bon fonctionnement du marché intérieur et la compétitivité de l'industrie chimique. Les aspects écologiques, économiques et sociaux du développement doivent être pris en considération de manière intégrée et équilibrée pour atteindre un objectif de durabilité (Commission des Communautés Européennes, 2001). Au terme du Grenelle de l'Environnement, la France a décidé de réduire de moitié l'usage des pesticides d'ici 10 ans. Ce plan dénommé « Ecophyto 2018 » ,comprend également le retrait du marché des préparations contenant les 53 substances actives les plus préoccupantes, dont 30 avant la fin de l'année 2008 (Ministère de l'Agriculture et de la pêche, 2008).

## **B. Les processus de transfert des pesticides dans les écosystèmes**

### **1. Devenir et transport des pesticides dans l'environnement**

La circulation et le transfert des pesticides en dehors des parcelles traitées peut se faire via le sol (drainage, ruissellement), mais aussi via l'air (brumes de pulvérisation, poussières de traitement de semences ou de granules, volatilisation), et contribue à une exposition diffuse des organismes dans l'environnement. Pour comprendre ces phénomènes de déplacement entre l'eau, l'air, le sol, et la bio-accumulation, Donald Mackay a par exemple adopté une nouvelle approche d'application du concept thermodynamique de la fugacité au comportement des produits chimiques dans l'environnement (MacKay, 2001). La fugacité est la tendance d'un produit chimique à se distribuer lui-même de façon qu'il puisse être évalué à partir de ses propriétés physico-chimiques telles que la solubilité et la tension de vapeur. Cette approche a été essentielle à la détermination de questions telles que la façon dont les produits chimiques se déplacent entre l'eau, l'air et le sol, ainsi qu'à la compréhension de la bioaccumulation de ces produits. Récemment, un modèle plus complexe a permis de donner une bonne représentation quantitative des polluants par exemple dans les eaux courantes (Warren et MacKay, 2005). Cependant, la répartition et la dispersion des divers polluants, dont les pesticides, dans l'ensemble de la biosphère ne sont pas seulement conditionnées par les seuls facteurs abiotiques qui régissent la circulation atmosphérique et celle de l'eau dans les sols et l'hydrosphère (Smith et al., 2007). Toute substance qui contamine le milieu naturel est susceptible d'être ingérée par les êtres vivants. Il est difficile de faire la distinction entre les différentes voies d'absorption (ingestion, inhalation, contact) et plusieurs voies peuvent être impliquées dans l'absorption d'une substance par un organisme donné. Les organismes qui ont accumulé une substance toxique vont alors servir de nourriture à d'autres espèces animales qui l'accumuleront à leur tour dans leurs tissus. Les polluants vont de la sorte être transférés dans les réseaux trophiques de divers écosystèmes, s'intégrer au cycle de la matière dans les biocoenoses et exercer une action néfaste sur de nombreuses espèces végétales et animales qu'elles comportent (Shore et Rattner, 2001).



## 2. Circulation et transfert des pesticides à travers les réseaux trophiques

### 2.1 Exposition, biodisponibilité et bioaccessibilité

Le transfert des pesticides à travers les réseaux trophiques est conditionné par deux processus : l'exposition des organismes au polluant et sa biodisponibilité.

L'exposition des organismes à un contaminant environnemental se produit lorsque le contaminant et le récepteur co-existent en un lieu et un temps donné (Smith et al., 2007). Cependant, la connaissance de la concentration totale d'un polluant dans l'environnement, ou dans les animaux cibles, ne présente souvent qu'un intérêt limité pour comprendre et prédire son transfert si cette part de contaminant n'est pas biodisponible pour les consommateurs.

La fraction du contaminant qui est susceptible d'être absorbée réellement par un organisme à partir de son environnement, c'est-à-dire sa biodisponibilité, est elle aussi déterminante dans la compréhension des processus de transfert (Armstrong et al., 2007; Dean et Ma, 2007). Cette fraction biodisponible au cours des processus digestifs est également appelée fraction bioaccessible (bioaccessibility). Par exemple, dans le cas du transfert trophique d'éléments trace métalliques, Wallace et Lopez (1997) ont montré que les mécanismes de détoxification chez un oligochète impliquant des structures de séquestration et de compartimentation intracellulaire (métallothionéines notamment) pouvaient influencer la biodisponibilité du cadmium pour les prédateurs tels que la crevette. Armstrong et al. (2007) ont quant à eux étudié la bioaccessibilité par une méthode *in vitro* d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) entre les plantes et des petits mammifères. Dean et Ma (2007) ont répertorié différentes approches permettant de déterminer la bioaccessibilité de polluants organiques persistants (POP) *in vitro*. Cependant, à notre connaissance, cette bioaccessibilité et son influence sur les relations proie – prédateur, dans le cas de composés organiques tels que les pesticides, est encore mal connue et semble complexe.

Le transfert de composés organiques le long de la chaîne alimentaire est représenté d'une manière générale dans la Figure 1. Les processus d'accumulation d'une substance dans tout ou partie d'un organisme, quelque soit la voie de pénétration considérée (ingestion, inhalation, contact), sont définis par le terme bioaccumulation. Le terme bioconcentration désigne quant à lui les processus par lesquels une substance prélevée dans le biotope par un être vivant va se rencontrer dans l'organisme de ce dernier à des concentrations supérieures à celles du milieu (eau, air et/ou sol) dans lequel il se trouve (Ramade, 2007).

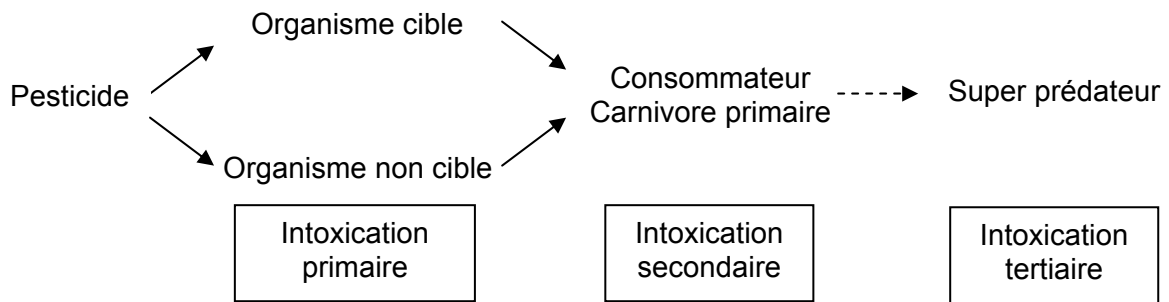


Figure 1. Schéma d'exposition des organismes aux pesticides.

Les processus de bioaccumulation surviennent avec pour conséquence l'intégration des polluants dans les réseaux trophiques. En se concentrant dans la biomasse, les substances toxiques se transfèrent vers les organismes situés au niveau le plus élevé de la pyramide écologique – carnivores primaires, secondaires puis super prédateurs. Les organismes cibles victimes d'intoxication primaire peuvent être exposés par une ou plusieurs des trois voies d'absorption (ingestion, inhalation, contact). Les carnivores primaires, prédateurs puis super prédateurs et charognards victimes d'intoxications secondaires ou tertiaires sont quant à eux exposés principalement par ingestion.

Le comportement des polluants dans les réseaux trophiques, décrit notamment par Ramade (2007) (Figure 2), peut être de trois types :

- **A.** Dans un premier cas, on constate un simple transfert de ces derniers d'un niveau trophique à l'autre sans changement de concentration au fur et à mesure que l'on s'élève dans le réseau trophique. Il concerne en particulier la plupart des éléments biogènes – divers métaux et métalloïdes – indispensables aux êtres vivants pour lesquels des phénomènes de régulation existent.
- **B.** Un second cas, est celui de substances incapables de franchir la barrière intestinale des vertébrés, ou encore de polluants organiques de synthèse, biodégradables, qui vont être biotransformés dans l'organisme. On observera ici une diminution de la concentration au fur et à mesure que l'on s'élève dans la chaîne trophique des consommateurs.
- **C.** Enfin, dans un dernier cas, surviennent des phénomènes de bioamplification (ou biomagnification). Parmi bien d'autres substances, ce phénomène peut se produire notamment avec des insecticides organochlorés ou polluants organiques persistants, peu ou pas biodégradables (Berg et al., 1992 ; Shore et Barnett, 2001). Dans ce cas, la

## I. Introduction Générale

concentration du toxique dans les êtres vivants s'élèvera à chaque niveau trophique : ce sont les super prédateurs, situés au sommet de la pyramide trophique qui présentent les taux de contamination les plus élevés.

La détermination de ce facteur de transfert entre les niveaux trophiques demande cependant une connaissance précise du régime alimentaire de chacun des organismes et nécessite de déterminer la concentration du polluant dans la totalité du corps. Pour des raisons pratiques, ces études ne peuvent donc se limiter qu'à des animaux de taille relativement modeste et ne peuvent être réalisées dans le cas de chaînes alimentaires complexes impliquant des animaux du niveau trophique supérieur de grande taille.

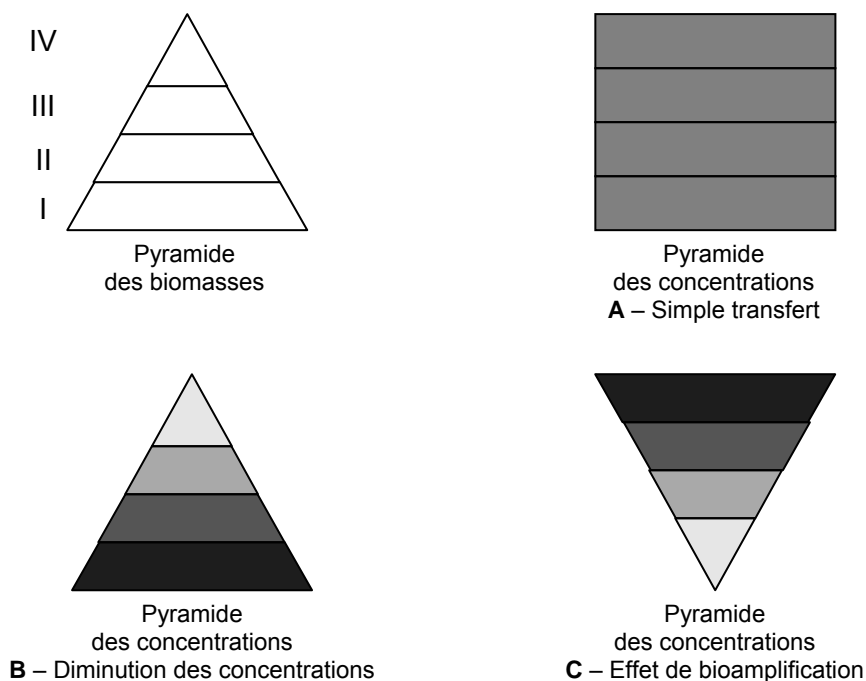


Figure 2. Principaux types de pyramide des concentrations de polluants selon la valeur du facteur de transfert dans les réseaux trophiques : sont ici comparées les pyramides des biomasses avec celles des concentrations selon la valeur du facteur de transfert. A :  $F_t = 1$  (simple transfert) ; B :  $F_t < 1$  (décroissance) ; C :  $F_t > 1$  (bioamplification) (d'après Ramade 2007).

## 2.2 Impacts des pesticides sur les écosystèmes

Après absorption par les organismes, lorsqu'un grand nombre d'individus est affecté, les effets des toxiques sont décelables au sein des populations dont les performances écologiques (taux de croissance, expansion, efficacité d'utilisation des ressources, adaptabilité...) peuvent être perturbées. A terme, les déséquilibres causés par la disparition ou, au contraire, l'expansion excessive de quelques populations (qui peuvent être dans ce cas considérées comme des bioindicateurs) peuvent se répercuter sur l'ensemble des

communautés, modifiant ainsi le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble (e.g. Caquet et Lagadic, 1998) (Figure 3). L'étude de Raoul et al. (2003) a montré notamment que l'empoisonnement secondaire de renards à la suite de traitement à la bromadiolone pouvait considérablement réduire la contamination de l'environnement par le parasite *Echinococcus multilocularis* dont il est l'hôte définitif et ainsi modifier son cycle dans l'écosystème considéré.

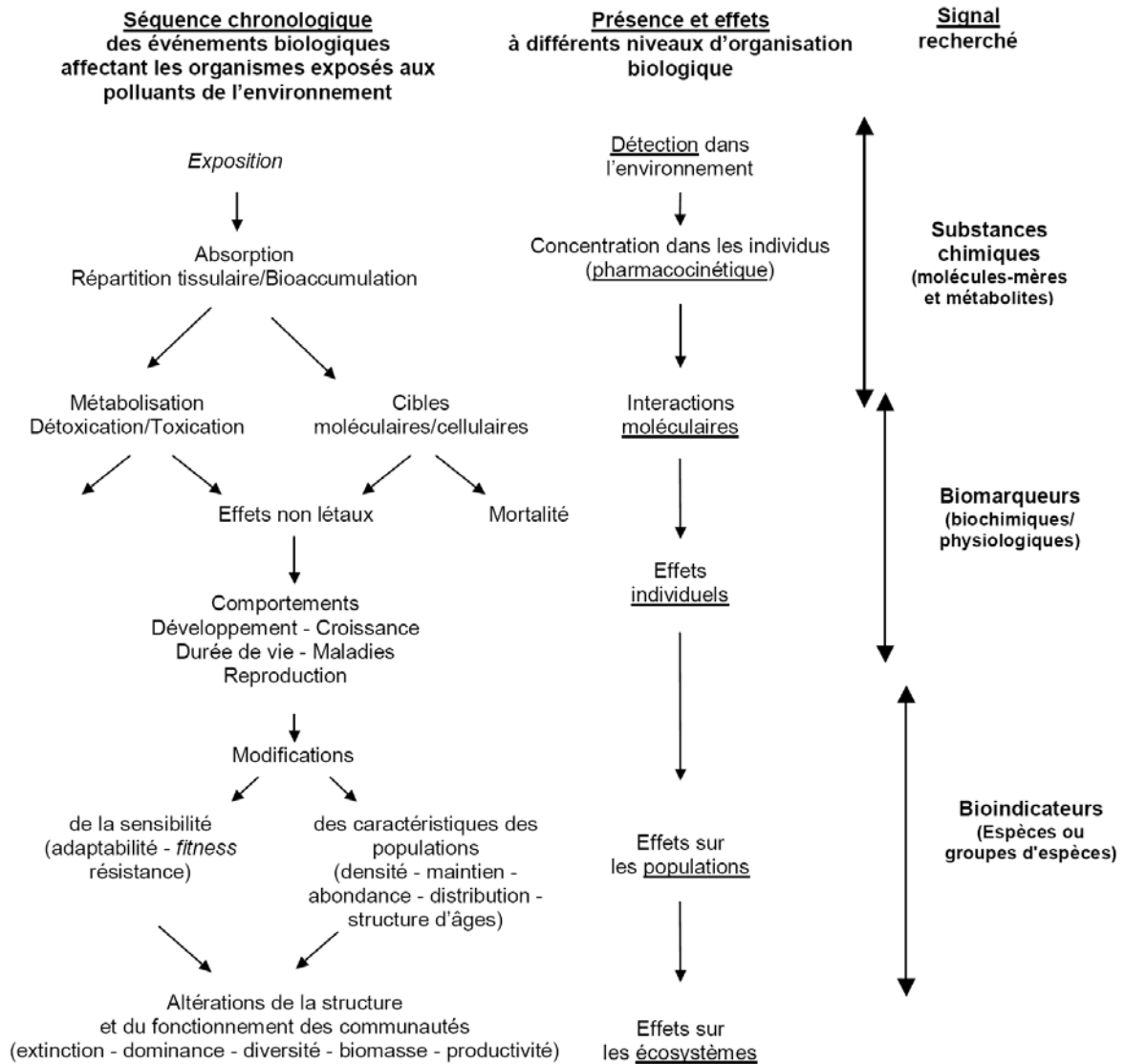


Figure 3. Chronologie théorique des effets induits par l'introduction d'un pesticide dans le milieu naturel (d'après Caquet et Lagadic, 1998) Le signal recherché (substance chimique, biomarqueur ou bioindicateur) sera défini dans le paragraphe I.B.3.1.2 p. 16

### **2.3 Un manque de connaissances pour les écosystèmes terrestres**

Si jusqu'à présent, les aspects de transfert de pesticides ont beaucoup été étudiés dans les écosystèmes aquatiques (récepteurs de contaminants), la récente expertise collective Aubertot et al. (2005) a montré le manque d'études traitant explicitement des impacts des pesticides sur la chaîne alimentaire dans les écosystèmes terrestres. En effet, si les effets de la consommation de ressources ont été abordés à différents niveaux trophiques, la question de la bioaccumulation des pesticides ou de leurs produits de dégradation n'est en général pas abordée spécifiquement dans ces études, particulièrement celles traitant des écosystèmes terrestres.

L'exposition des vertébrés terrestres peut inclure le contact direct, l'inhalation et l'ingestion d'aliments, solides ou liquides (eau), contaminés. Les deux voies d'inhalation et de contact peuvent induire des conséquences chez les vertébrés uniquement dans les cas où la toxicité par l'une de ces voies est avérée (Mineau, 2002 ; Sheffield et Lochmiller, 2001). Cependant, en raison de la tendance des animaux à quitter les parcelles lors du traitement, la voie alimentaire est considérée le plus souvent comme la voie majeure d'exposition (European Commission, 2002 ; Walker et al., 2008). Pour les organismes terrestres, il est donc important de disposer de données sur la contamination de la nourriture (Smith et al., 2007). Ce mode de transfert à travers les réseaux trophiques apparaît ainsi relativement simplifié et présente de ce fait un intérêt particulier d'étude de manière à comprendre les modalités de transfert à travers les réseaux trophiques. Les substances incriminées sont le plus souvent des pesticides organophosphorés, carbamates, organochlorés ou bien encore des rodenticides (Berny et al., 1997 ; Mc Laughling et Mineau, 1995). Dans la plupart des cas, ces incidents décrivant des intoxications d'organismes non cibles sont mis en évidence par des mortalités anormales faisant suite à la consommation d'aliments (proies, végétaux ou graines) contaminés. Lors d'une exposition directe (intoxication primaire), les granulés de formulation ou les semences traitées représentent un risque d'ingestion plus important lorsqu'ils peuvent être utilisés par les oiseaux comme nourriture ou comme particules de broyage. Des incidents impliquant des granulés de carbamates sont ainsi courants (Mineau et al., 1999).

De nombreux cas de rapaces intoxiqués avec des organophosphorés ont été décrits par les réseaux de surveillance et dans la littérature scientifique. Ils concernent par exemple la chouette effraie, le faucon crécerelle, la buse à queue rousse, la buse variable, le grand duc d'Amérique et le pyrargue à tête blanche (Berny et al., 1997 ; Stone, 1979 ; Story et Cox, 2001). Le retrait des composés organochlorés a contribué à une diminution du nombre des

incidents (Stoate et al., 2001) qui sont pour une grande part aujourd'hui le fait des produits rodenticides (Boatman et al., 2004). Les mammifères n'étant généralement ni moins sensibles aux pesticides que les oiseaux, ni moins exposés, un bilan environnemental assez similaire peut être attendu. Pourtant, le retour du terrain sur les effets non-intentionnels des pesticides sur ce groupe d'organismes est moins bien documenté (Aubertot et al., 2005).

### **3. Méthodes de diagnostic des contaminations et des impacts**

Bien souvent, la première démarche nécessaire pour estimer les effets potentiels d'une substance polluante dispersée accidentellement ou de façon chronique dans l'environnement consiste à connaître tout d'abord sa distribution et sa concentration, tant dans un biotope que dans les principaux constituants de la biomasse. En parallèle sont alors menées des études visant à modéliser la persistance du polluant dans le milieu extérieur, son comportement dans les organismes, puis son transfert à travers les réseaux trophiques. Des études à différentes échelles de temps et d'espace réalisées en laboratoires ou en nature permettent d'adapter les paramètres de ces modèles et de mieux comprendre et prévoir les effets des pesticides sur la santé des populations et des écosystèmes contaminés (Hoffman et al., 2003). Ces trois approches différentes seront présentées ci-dessous.

#### **3.1 Observer et surveiller**

La surveillance permanente de l'environnement tant en ce qui concerne les habitats terrestres qu'aquatiques, est depuis quelques années désignée par le terme anglais de *monitoring* ou *biomonitoring*. Les méthodes qui permettent l'évaluation de la qualité des milieux naturels sont schématiquement réparties en deux catégories distinctes, les méthodes d'analyse physico-chimiques d'une part et les méthodes biologiques d'autre part (Aubertot et al., 2005, Ramade, 2007).

##### **3.1.1 Méthodes physico-chimiques**

La mise en oeuvre de l'approche physico-chimique constitue la démarche la plus ancienne et la plus utilisée pour apprécier la qualité des milieux. Des méthodes permettant l'analyse simultanée de plusieurs pesticides dans les matrices environnementales sont disponibles (e.g. Berny et al., 1995 ; Font et al., 1993 ; Marek et Koskinen, 2007 ; Stout et al., 1998). Cependant, aucune méthode ne permet de détecter et de quantifier

simultanément tous les pesticides présents dans un échantillon. Dans le cas d'analyse de tissus animaux, le choix de la matrice est déterminant suivant les propriétés de la substance (élimination rapide ou stockage dans un tissu particulier) et une méthode analytique doit être validée pour ce tissu avec une limite de détection inférieure au seuil pour lequel des effets biologiques peuvent être observés. Même si cette approche présente de nombreuses autres limites (Aubertot et al., 2005), la surveillance environnementale est incontournable, par exemple pour le suivi post-homologation des substances dans l'environnement.

### 3.1.2 *Approches biologiques*

Les effets de l'introduction d'un pesticide dans un écosystème peuvent se produire à différents niveaux d'organisation biologique, depuis celui des individus et des populations, jusqu'à celui de l'écosystème dans son ensemble, en passant par les assemblages d'espèces et les communautés (Caquet et Lagadic, 1998). Des paramètres biologiques peuvent être mesurés à ces différents niveaux et constituer autant de signaux indiquant qu'une perturbation a eu lieu. Dans le cadre de l'évaluation de la qualité des milieux naturels, plusieurs stratégies biologiques complémentaires peuvent être utilisées (Amiard et al., 1998) : mesure de **biomarqueurs**, analyses sur des **espèces sentinelles** et recherche de **bioindicateurs**. L'utilisation notamment de biomarqueurs en toxicologie de l'environnement est très précieuse (Eason et O'Halloran, 2002) et permet de déterminer l'impact d'un polluant sur les organismes. Certains auteurs considèrent le xénobiotique lui-même et/ou ses métabolites comme biomarqueurs lorsqu'il est possible de les mesurer au niveau des tissus (Timbrell et al., 1994) alors que d'autres (Lagadic et al., 1997) considèrent qu'il s'agit là de *biomonitoring*. Nous retiendrons la définition suivante : un biomarqueur est actuellement défini comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic et al., 1997). Il est classique de distinguer trois types de biomarqueurs : les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effet de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets.

Ces deux approches, physico-chimiques et biologiques ont été décrites principalement par Caquet et Lagadic (1998) et sont schématisées dans la Figure 3 en fonction du niveau d'organisation observé.

### **3.1.3 Réseaux de surveillance**

En Europe, il existe quelques réseaux de surveillance susceptibles de fournir des renseignements sur les effets non-intentionnels des pesticides sur les espèces non-cibles mais tous les pays n'en sont pas dotés. Une enquête dont les résultats ont été publiés en 1999 indiquait que seuls 7 pays européens (sur les 18 contactés) enregistraient de façon systématique les incidents associés aux pesticides : Allemagne, Danemark, France, Grèce, Norvège, Pays-Bas et Royaume-Uni. Les deux réseaux les mieux organisés sont le réseau SAGIR en France et le *Wildlife Incident Investigation Scheme* (WIIS) au Royaume-Uni (de Snoo et al., 1999).

L'intérêt des réseaux de surveillance est notamment de servir de « garde-fou » en s'assurant que les usages autorisés des substances n'ont pas de conséquences imprévues notamment dans le cas de mortalité importante d'espèces sentinelles connues pour être ciblées par le transfert d'une molécule particulière (Raoul et al., 2003). Associées à une autopsie et à un dosage de la molécule suspectée dans les tissus de l'animal, les données du réseau SAGIR ont permis par exemple de mettre en évidence les effets néfastes de l'usage intensif de la bromadiolone sur divers vertébrés sauvages (Berny, 2007 ; Berny et al., 1997). Cependant, la probabilité qu'un incident soit recensé par les réseaux de surveillance comme le SAGIR ou le WIIS est faible, et le pourcentage d'incidents qui sont effectivement recensés n'est pas connu. Il est donc impossible de quantifier la sous-estimation de l'information et ce mode de surveillance de l'apparition de mortalité ne peut être considéré comme une mesure de l'exposition non biaisée. Elle est cependant malheureusement et dans bien souvent des cas l'un des seuls moyens actuels pour mesurer l'exposition des populations vertébrées en nature.

## **3.2 Modéliser**

### **3.2.1 De l'environnement à l'organisme - Processus toxicocinétique**

Après l'introduction d'un pesticide dans l'environnement, du fait de sa dégradation progressive, l'exposition des organismes présents dans ce milieu va diminuer en fonction du temps (Figure 5.a). Cette vitesse est intrinsèque au milieu et à la substance introduite. Pendant ce temps, le pesticide va être absorbé par les organismes et la concentration interne dans le corps de chacun d'eux va augmenter progressivement en fonction du temps. Des modèles de toxicocinétique prennent en compte tous les facteurs influençant l'accumulation et visent à prédire la concentration interne à l'équilibre accumulée par un organisme en fonction des doses présentes dans l'environnement (Widianarko et Van



Straalen, 1996). Cette toxicocinétique est fonction du taux d'absorption, de distribution, de biotransformation (métabolisation) et d'excrétion de la substance toxique (Walker et al., 2006). Lorsque la quantité de pesticide absorbée par l'organisme est supérieure à celle biotransformée et excrétée, la concentration augmente. A l'équilibre, la quantité absorbée est égale à la quantité biotransformée plus celle excrétée, la concentration maximale est atteinte dans le corps des organismes. Par la suite, la biotransformation et l'élimination sont prépondérantes et la concentration diminue (Figure 5.b). Les mécanismes d'absorption, biotransformation et excrétion sont schématisés pour un modèle simple, sans compartiment de stockage, dans la Figure 4.

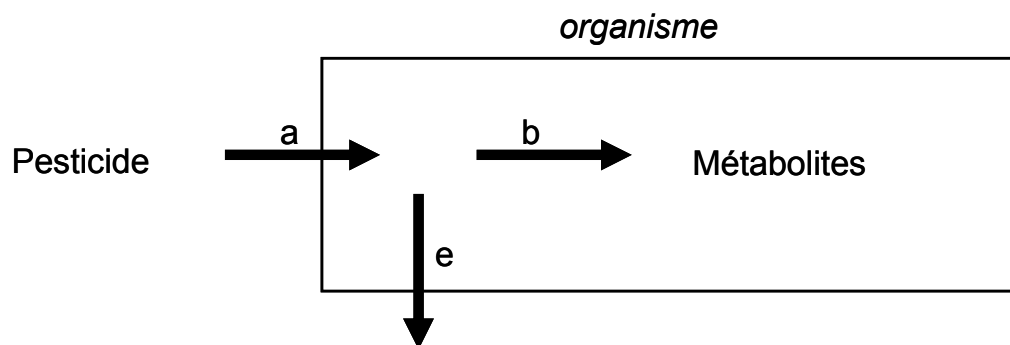


Figure 4. Représentation schématique d'un modèle toxicocinétique à un compartiment avec l'absorption du pesticide (a), sa biotransformation (b) et son élimination (e).

Le risque pour les organismes est alors fonction du taux de dégradation du pesticide dans le milieu, de la quantité absorbée par l'organisme et de sa toxicité (Figure 5.c). Le taux de survie des individus (Figure 5.d) intègre alors ces trois paramètres et est compris entre 1 et 0. Un plateau supérieur à 0 peut être atteint par exemple lorsque après un certain temps, le pesticide a disparu de l'environnement. Les organismes ayant subsisté jusqu'alors ne subiront donc aucune nouvelle mortalité (Widianarko et Van Straalen, 1996).

Si cette approche permet de comprendre les processus d'accumulation au niveau individuel dans l'organisme, elle n'a, à notre connaissance, que très peu été abordée au niveau populationnel (Newman, 2001). De plus, cette modélisation de toxicocinétique individuelle apporte peu à une connaissance des processus de transfert à travers la chaîne alimentaire. Pour cela différents modèles ont été développés dans le but de prédire le transfert à travers les niveaux trophiques.

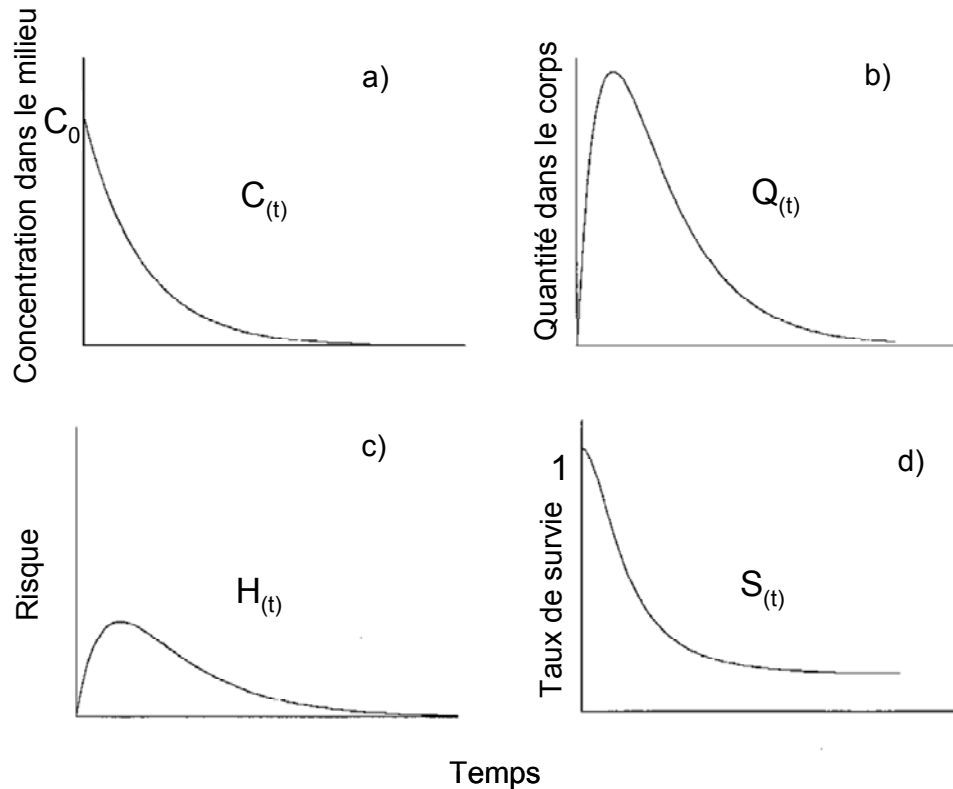


Figure 5. Courbes montrant la concentration d'exposition suite à une contamination ponctuelle de l'environnement à  $C_0$  (a), la quantité absorbée dans le corps de l'organisme (b), le risque encouru par les organismes présents dans le milieu (c) et le taux de survie des organismes (d) (d'après Widianarko et Van Straalen, 1996).

### 3.2.2 Modélisation du transfert entre les niveaux trophiques

De nombreux travaux ont eu pour objet de modéliser le transfert des polluants dans les réseaux trophiques (e.g. Lodal et Hansen, 2002), dans le but de déterminer la concentration et le facteur de transfert d'un niveau trophique donné connaissant les facteurs de transfert et les concentrations dans les niveaux trophiques inférieurs. Nous pouvons par exemple supposer qu'un prédateur situé au niveau trophique  $n+1$  renferme une concentration  $X_{n+1}$  d'un polluant donné, lui-même présent à la concentration  $X_n$  dans sa proie de niveau trophique  $n$ . Le facteur de transfert  $F_t$  du polluant concerné du niveau trophique  $n$  au niveau  $n+1$  sera défini par le rapport :

$$F_t = \frac{[n+1]}{[n]} = \frac{X_{n+1}}{X_n}$$

Où [n] et [n+1] désignent respectivement la concentration des polluants dans les niveaux trophiques considérés (Ramade, 2007).

Dans le cas de chaînes vertébrées terrestres, ces modèles peuvent intégrer différents paramètres pour quantifier les transferts dans des chaînes trophiques. Par exemple, le modèle de Miller (1978) intègre la masse corporelle du prédateur, celle de la proie, la concentration du polluant mesurée dans la proie, la fraction absorbée du polluant par le prédateur et celle qu'il excrète. Le modèle plus général de Traas et al., (1996) a été quand à lui établi pour le transfert dans la chaîne trophique terrestre à partir du sol jusqu'aux prédateurs. Il n'utilise pas les facteurs de transfert mais seulement les facteurs de bioaccumulation des organismes situés aux divers niveaux trophiques. Ce modèle tient notamment compte de la part des diverses proies (oiseaux, mammifères, invertébrés et plantes) dans le régime alimentaire. Cependant, certains animaux sont omnivores et des super-prédateurs peuvent se nourrir de proies situées à des niveaux trophiques différents. La modélisation du transfert de pesticides dans les réseaux trophiques présente donc certaines limites. La significativité de ces différents modèles est une fois de plus liée au degré de représentativité de l'environnement propre aux divers paramètres introduits et l'ajustement des paramètres de ces modèles nécessite bien souvent des études complémentaires « réelles » comme validation. Réalisées à différentes échelles et en vue de comprendre et prévoir les effets sur les écosystèmes, leurs approches seront détaillées dans le paragraphe suivant.

### **3.3 Comprendre et prévoir les effets sur les écosystèmes**

Il existe plusieurs échelles d'investigation permettant de comprendre et de prévoir le comportement et les effets des polluants chimiques dans l'environnement. Nous pouvons distinguer deux types de démarches (Aubertot et al., 2005 ; Hoffman et al., 2003).

#### **3.3.1 *En laboratoire***

La première, propre à la toxicologie de l'environnement, de nature réductionniste, concerne les travaux effectués *in vitro*, en laboratoire dans des dispositifs expérimentaux allant de l'éprouvette aux microcosmes. Ces dispositifs plus ou moins élaborés ne sont jamais représentatifs des facteurs écologiques propres aux conditions naturelles mais ont l'avantage de présenter une répétitivité importante et de présenter la possibilité de faire varier un ou plusieurs paramètres de manière contrôlée.

### 3.3.2 *In situ*

L'autre démarche qui s'effectue à de plus grandes échelles spatiales, et très souvent temporelles, se rapporte à des recherches effectuées *in situ* sur des communautés exposées à l'action des facteurs écologiques en vraie grandeur. Nous pouvons distinguer trois types de dispositifs expérimentaux qui présentent un degré de complexité ainsi que de représentativité écologique de plus en plus élevée : les mésocosmes, les enclos et les fractions d'écosystèmes isolées virtuellement voire physiquement.

*Remarque :*

*Le premier et le dernier type d'outil (Observer et surveiller ; Comprendre et prévoir les effets sur les écosystèmes) sont le plus souvent utilisés a posteriori, c'est à dire une fois que les substances ont été utilisées. Le second outil (Modéliser) permet à la fois un diagnostic de l'état actuel d'une situation (évaluation d'un programme de protection phytosanitaire au niveau d'une parcelle, des pratiques au niveau d'une exploitation, de l'efficacité d'une politique, etc.) et une démarche prospective par simulation (conséquences d'une substitution de substances par exemple) (Aubertot et al., 2005). Se pose alors le problème de la validation des modèles en condition naturelle qui n'est presque jamais résolu.*

## 4. Un manque de connaissance sur ces processus

La synthèse collective Aubertot et al. (2005) a montré une méconnaissance générale des propriétés, des utilisations et des processus de transfert dans l'environnement des substances existantes. La bonne compréhension de la répartition des pesticides entre les différents compartiments environnementaux « primaires » (sol, végétation et air) lors de l'épandage est essentielle pour un paramétrage correct des modèles de transfert dans l'environnement (eau, sol, air) à d'autres échelles, voire des modèles d'absorption par la faune ou l'homme. Les recherches ont permis de mettre en évidence bon nombre de cibles biologiques et biochimiques des substances actives et de leurs métabolites. Cependant, l'écotoxicologie n'a que timidement abordé les aspects plus intégrés, que sont les impacts mesurés à l'échelle des écosystèmes, qui incluent l'analyse des modalités d'exposition aux différents niveaux du réseau trophique et l'analyse des réponses des populations et des communautés, y compris les effets indirects via les interactions au sein des réseaux trophiques. La raison tient à l'extrême complexité de la problématique posée. Par exemple, pour les oiseaux et les mammifères, il est fréquemment difficile d'appréhender le niveau des populations et celui des communautés, du fait de la taille des territoires exploités par ces

organismes (Kendall et Lacher, 1994). Les résultats obtenus au Royaume-Uni ont clairement montré que ce n'est qu'en se plaçant au niveau de l'écosystème et du paysage que les effets sur les oiseaux par exemple peuvent être évalués (Potts, 1986). Les recherches ont pour l'heure portés presque essentiellement sur les écosystèmes aquatiques, grâce au développement d'écosystèmes expérimentaux (micro- et mésocosmes), et à la mise au point de modèles écologiques (réseaux trophiques modélisés). Le milieu terrestre ajoute une difficulté supplémentaire par son caractère plus « ouvert » pour certaines espèces, ainsi que par une plus grande diversité des compartiments qu'il renferme. Pourtant, c'est par la compréhension des modalités d'impact sur les différents éléments constitutifs de ces écosystèmes que des outils réellement prédictifs des impacts des pesticides pourront être proposés et que des réponses quant aux mesures permettant de limiter les impacts pourront être apportées (Moriarty, 1999 ; Smith et al., 2007 ; Walker et al., 2006).

Parmi les écosystèmes terrestres, les synthèses des réseaux de surveillance de la faune sauvage montre une importance toute particulière des intoxications de vertébrés aux anticoagulants (Barnett et al., 2006 ; Boatman et al., 2004 ; SAGIR, 1990-2007). Qu'ils soient utilisés pour lutter contre les ennemis des cultures ou encore contre les rongeurs commensaux vecteurs de nombreux pathogènes, les anticoagulants rodenticides illustrent les enjeux liés à l'utilisation de pesticides à travers une chaîne alimentaire impliquée dans le transfert relativement simplifiée (la contamination des espèces se faisant essentiellement par ingestion) (Erickson et Urban, 2002). Ils présentent de ce fait un intérêt particulier d'étude. Leur application peut être à la fois très localisée (dans une cave ou un grenier) et extrêmement diffuse (plusieurs dizaines de milliers d'hectares, dans le cadre de la lutte contre des rongeurs de prairie) (FREDON Franche-Comté et al., 2006). L'apparition de résistance chez les espèces cibles a nécessité la mise sur le marché de molécules de plus en plus toxiques et les risques qui avaient été prédits comme faibles sont apparus lors de leur utilisation massive. Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée à ce jour, un transfert à toute la chaîne alimentaire jusqu'à l'homme est théoriquement possible lorsqu'il se nourrit de gibier ayant ingéré des appâts ou des rongeurs intoxiqués (e.g. une trentaine de sangliers retrouvés morts des suites d'hémorragies et présentant des résidus de bromadiolone dans leur corps en 1998 pour le département du Doubs) (SAGIR, 1990-2007). Malgré leurs impacts sur les écosystèmes, qu'il s'agisse des propriétés intrinsèques de chacune des substances chimiques ou d'études de l'exposition qui est fonction de leur utilisation, leur évaluation du risque reste très peu documentée (USEPA, 1998). C'est donc vers ce modèle d'étude que nous avons centré nos travaux en vue d'apporter des connaissances nouvelles à la compréhension du transfert d'un pesticide, la bromadiolone, dans les réseaux trophiques.

## **C. Modèle d'étude : Le transfert d'un anticoagulant rodenticide, la bromadiolone, à travers les réseaux trophiques lors de son utilisation pour contrôler les populations de Campagnol terrestre *Arvicola terrestris***

### **1. Les anticoagulants rodenticides...**

C'est en 1921 qu'un vétérinaire canadien Schofield décrivit sous le nom de « *sweet clover disease* » une maladie hémorragique du bétail consécutive à l'ingestion de mélilot moisi. Il ouvrait ainsi la porte à des travaux qui menèrent, en 1941, à l'isolement de la substance responsable de ces accidents, une molécule naturelle 3,3'-methylene-bis(4-hydroxycoumarin), appelée par la suite dicoumarol (Shore et Barnett, 2001). L'intérêt pratique de cette découverte fut mis en évidence en 1948 par O'Connor (1948) qui proposa l'utilisation du dicoumarol comme raticide. Ont suivi de nombreuses molécules analogues et notamment la warfarine (ou coumafène) dans la même année (Pelfrene, 1991), introduite à la fois comme antithrombotique et à l'origine d'un médicament efficace pour le traitement des thromboembolies chez l'homme, mais aussi en tant que rodenticide. Depuis cette époque les anticoagulants rodenticides anti-vitamine K sont très largement utilisés dans le monde pour contrôler les populations de petits mammifères, et occupent la première place dans la lutte contre différents rongeurs anthropophiles commensaux (rat noirs, surmulots, souris) ou ravageurs des cultures (mulots, campagnols, ragondins) (Erickson et Urban, 2002). En fonction de la substance active, ils peuvent être ainsi utilisés soit dans ou autour des bâtiments ou alors en nature pour contrôler les rongeurs champêtres et certains autres mammifères « nuisibles ». Les anticoagulants présentent de nombreux avantages, notamment celui d'avoir une action différée par rapport à l'ingestion de l'appât permettant ainsi d'éviter leur refus observé avec des toxiques plus foudroyants mais aussi celui de posséder un antidote (la Vitamine K1) qui permet de réduire considérablement les accidents chez l'homme et les animaux domestiques (Kolf-Clauw et al., 1995). Ces caractéristiques sont expliquées par le mécanisme d'action de ces substances qui interviennent en bloquant le cycle de la vitamine K (Le Bonniec, 2004) (Figure 13) que nous détaillerons ci-après.

### **1.1 ... nécessaires pour lutter contre les rongeurs...**

Les rongeurs peuvent constituer des réservoirs pour différentes maladies transmissibles à l'homme (maladies à transmission vectorielle telles que la leptospirose, la peste, le virus des fièvres hémorragiques à syndrome rénal, l'échinococcose alvéolaire, etc.) (Le louarn et Quéré, 2003 ; Pejcoch, 2006 ; Trembl et al., 2002). Par exemple, les populations urbaines de rats peuvent présenter des densités de 2 à 3 rats par habitant (WHO, 1982). Leur nourriture y est en effet abondante et leur statut anthropophile renforce alors le problème de santé publique. De plus, parmi les pestes agricoles, les rongeurs sont à eux seuls responsables d'importantes pertes économiques liées à la destruction d'environ 20% des récoltes céréalières mondiales (Riba et Silvy, 1989), tant sur les dommages aux cultures sur pieds qu'aux denrées alimentaires stockées. Dans ce contexte, la lutte contre les rongeurs apparaît de ce fait indispensable et fait intervenir plusieurs méthodes biologiques (e.g. en favorisant les prédateurs) ou physiques (e.g. piégeage). Cependant, la lutte chimique à l'aide d'anticoagulants reste principale. Dans les années 70, de nouvelles molécules plus toxiques, ayant un mode d'action semblable, ont été développées pour résoudre les problèmes de résistance aux anticoagulants de première génération et améliorer la lutte contre les espèces non résistantes (Boschetti et al., 1972 ; Boyle, 1960 ; Marsh, 1977).

### **1.2 ... mais toxiques pour d'autres espèces**

Ces anticoagulants de seconde génération (SGARs) sont connus pour avoir une persistance dans les tissus animaux beaucoup plus longue (Erickson et Urban, 2002 ; WHO, 1995) et leur impact négatif sur la faune non-cible a été rapporté dans le monde entier (e.g. Angleterre: Mc Donald et al. 1998, Shore et al. 1996, Shore et al. 2003; France: Fournier-Chambrillon et al. 2004, Lambert 2007; USA: Stone 1999 2003; Nouvelle Zélande : Eason et al. 2002). Ces intoxications peuvent être de trois natures. Elles sont dites primaires lorsqu'elles interviennent à la suite de consommation directe d'appâts empoisonnés, secondaires, par consommation de cadavres ou de proies vivantes intoxiquées ou encore tertiaires résultant du transfert des anticoagulants à travers la chaîne alimentaire. Ces intoxications concernent de nombreuses espèces d'oiseaux ou de mammifères dont certaines sont protégées voire classées dans la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) comme potentiellement menacées avec par exemple le Milan Royal en Europe (Berny et Gaillet, 2008 ; Pain et al., 2007) et le Puma en Amérique

(Riley et al., 2007). Certaines des espèces concernées par ces intoxications sont considérées comme en danger d'après l'UICN avec par exemple le Vison d'Europe (Fournier-Chambrillon et al., 2004).

La bromadiolone, anticoagulant dit de seconde génération, est inscrite aux annexes I et II des directives européennes 91/414/CE et 98/8CE. Du point de vue réglementaire elle est donc considérée en Europe comme à la fois un produit « phytosanitaire » protégeant les végétaux mais aussi comme un « biocide antiparasitaire » pour lutter contre les souris, les rats ou autres rongeurs de milieux non agricoles. En induisant de nombreux cas d'intoxication de la faune non cible (Berny et al., 1997 ; Raoul et al., 2003 ; SAGIR, 1990-2007) et en présentant des enjeux bien souvent conflictuels, son utilisation pour contrôler les populations de rongeurs de prairie tel que le Campagnol terrestre *Arvicola terrestris Sherman*, illustre la problématique du transfert des pesticides dans les réseaux trophiques. La contamination de l'environnement a été constatée notamment par l'observation d'une diminution spectaculaire de densités relatives de renards (pouvant s'apparenter à une espèce « sentinelle ») dans les zones traitées, suggérant une mortalité importante (Raoul et al. 2003) ou encore par le *monitoring* de la bromadiolone dans les cadavres collectés en nature (Berny et al., 1997 ; Kupper et al., 2006 ; SAGIR, 1990-2007). L'*Environmental Protection Agency* américaine soulignait dès 1998 (USEPA, 1998) l'urgence de développer des recherches *in situ* sur l'évaluation du risque environnemental lié à l'utilisation des rodenticides chimiques et notamment la nécessité de comprendre comment ils sont transférés dans les écosystèmes. Or à ce jour, le comportement de la bromadiolone dans l'environnement est très mal connu (Erickson et Urban, 2002 ; USEPA, 1998). Comme souligné précédemment, ces connaissances sont fondamentales pour comprendre les processus de transfert de la molécule vers la faune non-cible et évaluer puis gérer les risques liés à son utilisation.

*Au cours de ces travaux nous avons centré nos recherches sur l'utilisation de la bromadiolone en tant que produit phytosanitaire et nous essayerons de comprendre les modalités de son transfert à travers les réseaux trophiques lors de son utilisation en nature pour contrôler les populations de Campagnol terrestre, Arvicola terrestris Sherman. A travers ce modèle d'étude, nous détaillerons les principales informations concernant l'utilisation des anticoagulants en tant que rodenticide tout en décrivant plus spécialement les particularités liées à l'utilisation de la bromadiolone en nature. Nous nous tournerons ensuite vers les méthodes actuelles permettant d'évaluer son transfert à travers les réseaux trophiques. Les paramètres nécessaires, d'une part à la compréhension de son impact sur l'environnement, d'autre part à la mise au point des protocoles expérimentaux, des méthodes analytiques et à la compréhension et à l'interprétation des différents résultats seront détaillés.*



### **2. L'exemple de la bromadiolone**

#### **2.1 Enjeux socio-économiques et environnementaux des pullulations de campagnols de prairie et de leur contrôle**

Dans de nombreux pays, particulièrement en Europe (Jura Suisse, Jura Français, Massif Central et Pré-Alpes notamment), la lutte chimique utilisant la bromadiolone, anticoagulant de seconde génération de la famille des hydroxycoumarines (3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-3-hydroxy-1-phenylpropyl]-4-hydroxycoumarin), est extensivement utilisée pour lutter contre les rongeurs de prairie. En France, la bromadiolone a été préconisée dès 1979 afin d'optimiser l'efficacité des traitements à l'encontre des pullulations de Campagnols terrestres et de limiter l'impact sur les espèces non cibles (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2002). Ces pullulations résultent de modifications des pratiques agricoles et du paysage des plateaux de moyenne altitude, et ont un impact sur le fonctionnement des agrosystèmes (Giraudoux et al., 1997). Des cycles de pullulations sont observés tous les 6 à 8 ans (Figure 6) avec des pics de densité pouvant être maintenus localement pendant 1 à 3 ans et alors atteindre en moyenne 500 individus par hectare, avec parfois plus de 1000 campagnols par hectare (Delattre et al., 1999a,b). Les surfaces concernées par les dégâts sont beaucoup plus vastes, la durée moyenne des cycles de pullulation s'étale sur des durées de plus en plus longues et les densités moyennes de populations de campagnols à l'hectare sont plus élevées (Delattre et al., 1999a,b). En effet, au cours des années 60, la production agricole de ces zones de moyenne altitude s'est spécialisée dans l'élevage de vaches laitières pour la fabrication de fromages notamment d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC). Cette évolution a conduit à la conversion de 80 % des cultures en prairies et pâturages, maintenant l'essentiel de la Surface Agricole Utile (SAU) en prairie permanente (Surface Toujours en Herbe STH) (FREDON Franche-Comté et al., 2006) et créant ainsi de vastes espaces homogènes très ouverts. Il en résulte donc une augmentation de la surface des habitats favorables aux campagnols, et une connectivité des prairies très importante (Berthier et al., 2005).

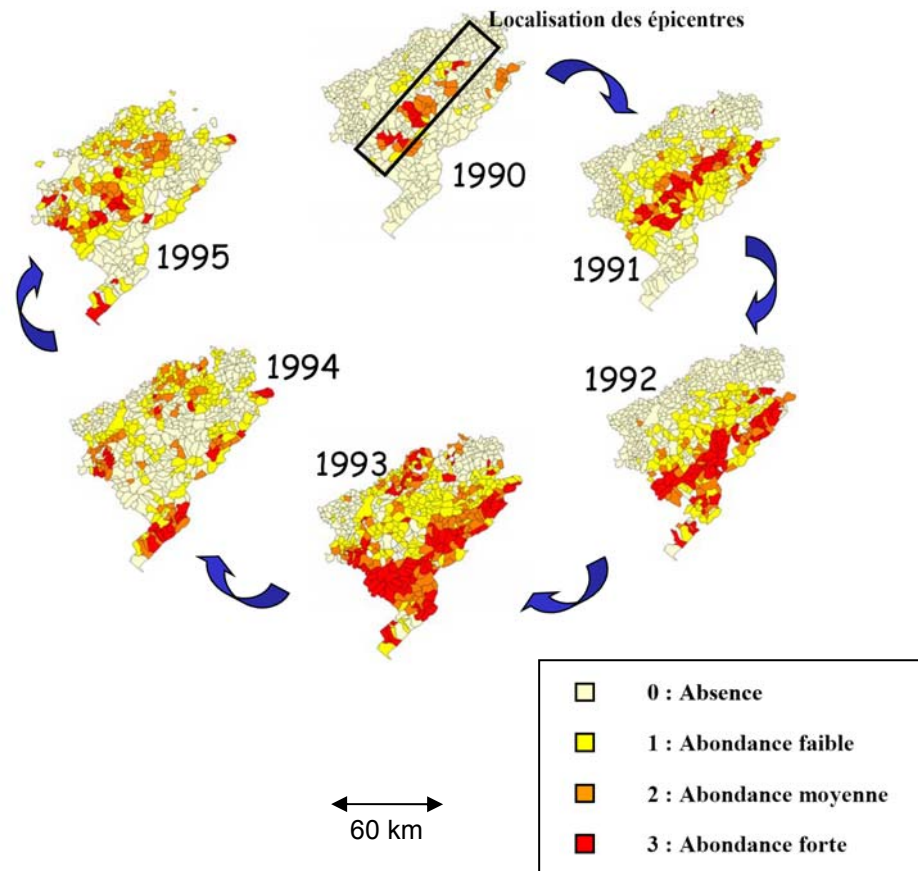


Figure 6. Diffusion spatiale des pullulations d'*Arvicola terrestris* dans le département du Doubs (Franche-Comté, France) entre 1989 et 1995, soit la durée d'un cycle (d'après Giraudoux et al., 1997)

Ces pullulations de Campagnol terrestre engendrent à la fois des **problèmes agronomiques, sanitaires et environnementaux**.

En effet, ce rongeur creuse son réseau de galeries souterraines, en rejetant la terre à la surface du sol, et se nourrit principalement des racines des végétaux (Airoldi et al., 1976). Ses pullulations ont un impact agricole de deux ordres. Elles diminuent à la fois la qualité des récoltes de fourrage (la composition floristique des prairies est modifiée, des espèces indésirables apparaissent, la terre souille le foin et altère la qualité du lait), mais aussi leur quantité (destruction du système racinaire des végétaux et présence de nombreux tumuli réduisant considérablement la quantité d'herbe produite) (Figure 7). Ces pullulations entraînant de fortes pertes économiques pour les agriculteurs (Delattre et al., 1996 ; Duhamel et al., 2000). Par exemple, en Franche-Comté, en 1998, une année de pic de pullulation, 120 000ha de prairies ont été fortement dégradés dont la moitié complètement

## I. Introduction Générale

---

ravagée. Les pertes ont été chiffrées par la Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt à plus de 38 millions d'euros pour 1 200 exploitations de la région (FREDON Franche-Comté et al., 2006).

D'autre part, le Campagnol terrestre étant un des hôtes intermédiaires du parasite *Echinococcus multilocularis* (Houin et al., 1982 ; Rausch, 1995), ses pullulations peuvent faciliter la transmission à l'homme de l'échinococcose alvéolaire, maladie potentiellement mortelle (Giraudoux et al., 2003 ; Viel et al., 1999). En Franche-Comté, 70% des personnes atteintes habitent le département du Doubs et la majorité se situe dans les communes de pullulation de Campagnol terrestre (Raoul et al., 2001).

Enfin, lors des phases de déclin des populations, le réseau ROPRE (1998) a décrit un potentiel report de prédation de la part de prédateurs tels que le renard vers d'autres proies que les Campagnols terrestres avec comme par exemple une diminution des populations de lièvre. Peu d'études ont cependant été réalisées jusqu'à présent sur ce sujet.



Figure 7. Photographie d'une parcelle lors d'un pic de pullulation – La Vrigne (25), Décembre 2006

Les moyens de contrôle des populations de Campagnol terrestre mis en oeuvre ont rapidement révélé leurs limites (Delattre, 2002). En effet, le piégeage est resté jusqu'à présent difficilement applicable par un agriculteur à l'échelle de son exploitation, car il exige un temps de travail considérable pour la mise en place et le relevé des pièges (FREDON Franche-Comté et al., 2006). Jusqu'à présent, la stratégie de lutte développée massivement a été celle de la lutte chimique par l'utilisation de la bromadiolone. Cette lutte chimique est menée sur de larges surfaces (e.g. 60000 km<sup>2</sup> pour les deux départements du Doubs et du

Jura en 1998). Des essais en laboratoire sur différentes espèces (hermine, buse variable) montraient un faible risque de mortalité d'individus nourris avec des campagnols intoxiqués (Grolleau, 1983). Les traitements ont permis une protection temporaire des récoltes. Pourtant, suite aux traitements en champ, de nombreux cas d'intoxication primaire et secondaire d'espèces non cibles (carnivores, rapaces, gibier) ont été constatés chaque année et notamment lors de fortes pullulations de rongeurs comme par exemple en 1998 et lors d'utilisation massive d'appâts empoisonnés. Ces espèces pour la plupart, sont des espèces prédatrices contribuant à la régulation des populations de campagnols et sont protégées (Berny et al., 1997 ; Kupper et al. 2006 ; Raoul et al., 2003 ; SAGIR, 1990-2007).

### **2.2 Modalités d'application**

Les anticoagulants se présentent essentiellement sous forme d'appâts prêts à l'emploi, de concentrats liquides servant à la préparation des appâts ou de poudre de pistes (USEPA, 1998 ; WHO, 1995). Les appâts sont placés là où les animaux ciblés se sentent en sécurité ou sur leurs lieux de passage. L'habitude qu'ont les rats et les souris de se lécher pour nettoyer leur pelage est mise à profit avec les poudres de piste (Kolf-Clauw et al., 1995). Les appâts sont très diversifiés. Ils doivent être attractifs pour les rongeurs, même à proximité de réserves de nourriture. Compte tenu du régime alimentaire assez varié des rongeurs, le support, base de l'appât, est constitué essentiellement de céréales (avoine, blé...) entières, concassées, décortiquées, aplaties ou moulues sous forme de semoule. D'autres supports appétants pour les rongeurs peuvent être utilisés tel que du pain, des betteraves ou des carottes. A ce support est ajouté le toxique à une concentration variable selon le composé, un colorant imposé par la législation le plus souvent rouge ou bleu et un agent d'amertume de type bitrex<sup>®</sup> réduisant ainsi le risque d'ingestion par de jeunes enfants. Il existe aussi des appâts présentés sous forme de granulés ou de blocs paraffinés. Ces derniers conviennent spécialement à un usage en milieu humide : extérieur des bâtiments, égoûts, bords des cours d'eau. Les concentrats servant à la préparation d'appâts sont réservés aux Groupements de Défense Contre les Organismes Nuisibles (GDON) ou aux professionnels de la dératisation. Ils ont l'avantage de pouvoir être mélangés à un support frais tel que des carottes ou betteraves très peu de temps avant le traitement rendant ainsi les appâts encore plus appétants.

Les molécules utilisées étant peu sélectives et les appâts pouvant être attractifs pour d'autres espèces non-cibles, dans un but de restreindre toute intoxication primaire, de nombreuses conditions doivent être respectées (Erickson et Urban, 2002 ; USEPA, 1998). En Europe, pour une utilisation « biocide » à l'intérieur et à proximité des bâtiments, les

appâts sont déposés dans des lieux fréquentés par les espèces ciblées. Ils peuvent être placés dans des boîtes d'appâtage aux dimensions permettant un accès uniquement aux espèces cibles. Cela n'empêche cependant pas les animaux plus petits que les adultes de l'espèce cible d'accéder aux appâts. Le choix de l'appât et de la molécule active est fait en fonction de la sensibilité de l'espèce cible, de son habitude alimentaire et du lieu de traitement de manière à optimiser l'efficacité du traitement. Pour une utilisation « pesticide », en nature, les appâts peuvent aussi être placés dans des boîtes d'appâtage ou être enterrés dans le sol, dans les galeries des rongeurs (USEPA, 1998 ; WHO, 1995). En Nouvelle Zélande ou dans le cas de difficulté d'accès à la zone de traitement, la distribution des appâts empoisonnés est parfois effectuée de manière aérienne (Dowding et al., 1999).

Dans le cas de la lutte contre le Campagnol terrestre, c'est en 1979 que l'utilisation de la bromadiolone a été autorisée en France sur des appâts carotte dosés à 0.01% de bromadiolone soit 100 mg de matière active par kg de carotte. Les appâts étaient alors préparés par les agriculteurs juste avant le traitement. La quantité maximale d'appâts frais utilisés par hectare était fixée à 40 kg soit 4 g de matière active. Face à la difficulté de mise en place des chantiers de traitement et à l'apparition de mortalités d'animaux non cibles, des expérimentations relatives à la mise au point d'appâts secs ont été menées depuis 1992. Dans le but de réduire la quantité de matière active utilisée à l'hectare tout en gardant une efficacité maximale (Grolleau, 1996 ; 1997 ; 1998), l'utilisation d'appâts grains de blé a été autorisée par l'arrêté ministériel de 1998 (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2002). La concentration des appâts et la quantité maximale d'appâts autorisée par hectare ont chacune été divisée par deux (20kg d'appâts dosés à 0,005% de bromadiolone soit 50 mg de matière active par kg et un maximum légal de 1 g de bromadiolone par hectare). Les opérations de contrôle sont alors devenues moins coûteuses et plus faciles à mettre en œuvre (préparation des appâts en quelques endroits par département et conservation possible des appâts pendant plusieurs mois entre leur préparation et les traitements). Depuis 2005, seule l'utilisation par les agriculteurs d'appâts prêts à l'emploi est autorisée et la préparation d'appâts par mélange de concentrat est interdite. Un arrêté ministériel définit les modalités de lutte et les GDON décident de la mise en oeuvre de la lutte. Les traitements peuvent être réalisés toute l'année mais les saisons pour lesquels ils sont le plus abondants sont l'automne et le printemps. Ils peuvent être réalisés à de très larges échelles comme par exemple à l'automne 1998, lors de l'autorisation d'utilisation d'appâts secs où 60 000 ha ont été traités pour la seule région de Franche Comté (FREDON Franche-Comté et al., 2006).

De manière à permettre un accès direct par les rongeurs et réduire une consommation par les organismes non cibles, les appâts sont distribués dans des galeries artificielles à l'aide d'une charrue sous-solleuse (Figure 8) à une quinzaine de centimètres de

profondeur. Cent grammes d'appâts sont ainsi distribués par mètre de galerie et les galeries doivent être espacées l'une de l'autre de 5 m minimum (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2002). Nous parlons alors de traitements « en plein » (Figure 8). Si dans les premières années, la lutte était plutôt dans une logique curative pour protéger les cultures lors des années de forte pullulation, les pratiques ont progressivement évolué. Avant tout traitement, un seuil d'infestation parcellaire est déterminé par la méthode des indices d'abondance de Giraudoux et al., (1995). En 1999, les traitements ont été interdits pour les parcelles dépassant le seuil d'infestation de 75% puis ce seuil a été abaissé à 50% en 2001. Actuellement, il est préconisé de ne traiter uniquement à très faible densité de rongeurs, avant l'apparition de pullulations. Nous parlons alors de traitement « au terrier » (FREDON Franche-Comté et al., 2006). La mise en place des plans d'actions successifs et l'évolution de la réglementation avec l'interdiction de traiter au-delà d'un seuil, ont conduit à une diminution forte des quantités d'appâts utilisées passant de 20 kg par hectare en 1998 à 5,6 kg en 2006 (FREDON Franche-Comté et al., 2006).



Figure 8. Photographie d'une charrue sous-solleuse (à gauche) et d'une parcelle après traitement (à droite).

### 3. Comportement dans les écosystèmes

#### 3.1 Classification des molécules anticoagulants rodenticides

Les molécules décrites dans ce chapitre sont celles utilisées principalement en agriculture pour la protection des récoltes et pour le contrôle des rongeurs en milieu urbain.

## I. Introduction Générale

Le but n'est pas ici de décrire toutes les données disponibles sur chacun des composés mais de faire la synthèse de l'essentiel des connaissances toxicologiques acquises sur les rodenticides anticoagulants nécessaires à la compréhension de leur impact sur l'environnement.

Les rodenticides anticoagulants se classent en trois familles chimiques distinctes :

- les dérivés de l'hydroxy-4 coumarine, dont la première molécule apparue est le coumafène, encore appelé warfarin. Appartiennent également à cette famille la bromadiolone, le coumachlore, le coumatétralyl, le difénacoum et le brodifacoum.
- les dérivés indane-dione, avec la chloropacinone et la diphacinone.
- les dérivés de l'hydroxy-4 benzothiopyranone, avec la diféthialone.

Ces dérivés présentent tous une analogie structurale avec les vitamines K (principalement : vitamine K1 naturelle, ou phytoménadione, et vitamine K3 synthétique, ou ménadione) (Kolf-Clauw et al., 1995 ; USEPA 1998) (Figure 9).

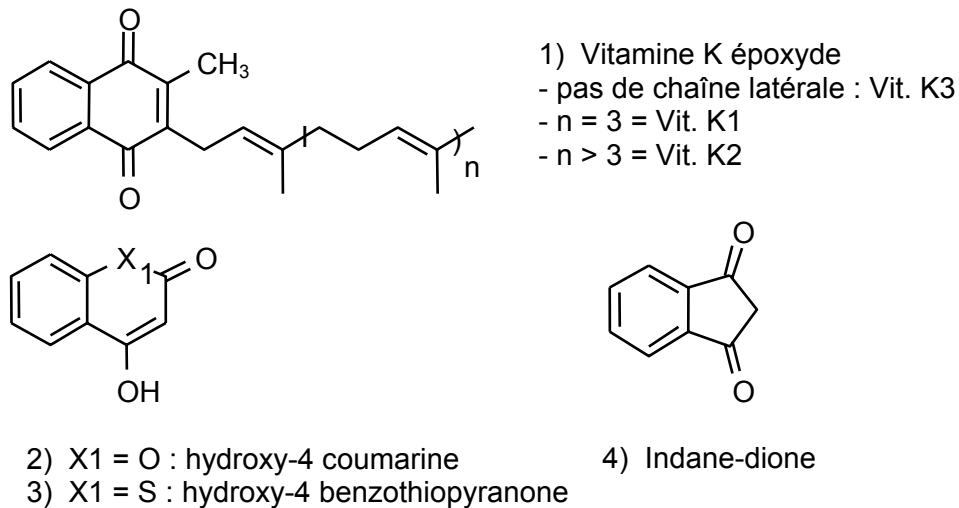


Figure 9. Structure semi-développée de la vitamine K époxyde (1) et des trois familles d'anticoagulants utilisés actuellement pour la lutte contre les rongeurs : hydroxy-4 coumarine (2), hydroxy-4 benzothiopyranone (3) et Indane-dione (4).

Nous distinguons en général deux générations d'anticoagulants :

- 1<sup>ère</sup> génération avec le coumafène, la chlorophacinone, la diphacinone et le coumatétralyl,
- 2<sup>ème</sup> génération avec la bromadiolone, le brodifacoum, le difénacoum, la diféthialone et le flocoumafène.

Les composés de première génération sont rapidement métabolisés et ne peuvent généralement pas entraîner d'hémorragie mortelle s'ils ne sont absorbés qu'une seule fois. L'animal visé doit donc se laisser tenter par l'appât plusieurs jours successifs pour y succomber. Les composés de seconde génération sont actifs après une seule prise et ont une toxicité et une persistance hépatique nettement supérieures aux composés de première génération (USEPA, 1998).

Tous ces composés sont des composés de synthèse. Si leur mode d'action reste sensiblement le même, leurs propriétés physico-chimiques diffèrent légèrement d'un composé à l'autre leur procurant une toxicité plus ou moins élevée suivant l'espèce considérée.

*Remarque :*

*D'autres composés non-anticoagulants sont commercialisés sur le marché de lutte contre les rongeurs et autres pestes agricoles tels que le chloralose, le cholecalciferol ou vitamine D3, le scilliroside et la crimidine. Ils appartiennent principalement à trois familles chimiques qui diffèrent l'une de l'autre de part leur mode d'action. Quantitativement, ces composés constituent un petit volume des ventes (<10%) (Lasseur, com pers). Ils peuvent présenter aussi des risques d'intoxication de la faune non cible (Erickson et Urban, 2002) mais ne seront pas détaillés ici.*



### 3.2 Propriétés physiques et chimiques de la bromadiolone

Les principales propriétés physiques et chimiques de la bromadiolone sont présentées dans la Table 1.

<b>Dénomination Commune Internationale</b> : bromadiolone
<b>Nom CAS</b> (Chemical Abstracts Service number) : 3-[3-(4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-hydroxy-1-phenylpropyl]-4-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one
<b>Nom IUPAC</b> : 3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-3-hydroxy-1-phenylpropyl]- 4-hydroxycoumarin
<b>Numéro CAS</b> : 28772-56-7
<b>Numéro RTECS</b> : (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances number): GN4934700
<b>Formule brute</b> : C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> BrO <sub>4</sub>
<b>Formule développée</b> : Voir Figure 10
<b>Principaux noms commerciaux</b> : Apobas, Bromard, Bromorat, Bromatrol, Contrac, Deadline, Hurex, Lanirat, Maki, Morfaron, Musal, Ramortal, Ratimon, Rodine-c, Slaymor, Super-caid, Topidon
<b>Aspect</b> : poudre blanc cassé inodore
<b>Masse moléculaire</b> : 527,4 g/mol
<b>Température de fusion</b> : 200-210°C
<b>Masse volumique</b> : 0.32 g.cm <sup>-3</sup>
<b>Pression (tension) de vapeur</b> : 2 x 10 <sup>-6</sup> à 20°C ; 1.6 e-10 mmHg à 25°C
<b>Solubilité dans l'eau</b> : 19mg L <sup>-1</sup> (insoluble)
<b>Solubilité dans les solvants organiques</b> : acetate ethyl : 25 g L <sup>-1</sup> acetone : 22.3 g L <sup>-1</sup> soluble chloroforme : 10.1 g L <sup>-1</sup> peu soluble diméthylformamide : 730 g L <sup>-1</sup> DMSO diméthylsulfoxyde : soluble ethanol : 8.2 g L <sup>-1</sup> soluble ether ethylique : 3.7 g L <sup>-1</sup> hexane : 0.2 g L <sup>-1</sup> insoluble methanol : 5.6 g L <sup>-1</sup>
<b>Vitesse d'hydrolyse</b> temps de demi-vie : >30 jour(s) au pH de 5 temps de demi-vie : >30 jour(s) au pH de 7 à 9
<b>Vitesse de photolyse dans l'eau</b> : DT50 : <0.1 jours au pH de 7.3
<b>Coefficient de partage octanol/eau</b> : K <sub>ow</sub> à 20°C et pH4 : >5 ; pH 7 : 4,07 ; pH10 : 3,16
<b>Classement</b> : T+ très toxique par inhalation, contact avec la peau et par ingestion - N - R26/27/28 - R48/23/24/25 - R50/53

Table 1. Propriétés physicochimiques de la bromadiolone (D'après AGRITOX INRA, 2007 ; WHO, 1995).

La molécule possède deux carbones asymétriques C11 et C13 d'où l'existence de deux diastéréo-isomères. Le carbone C11 porte un groupement phényle, C13 un hydroxyle. Dans un plan donné, lorsque les groupements phényle en C11 et hydroxyle en C13 sont du même côté, on obtient la configuration R,R et son image miroir S,S, autrement dit, 2

isomères optiques. Ces deux configurations constituent un diastéréo-isomère. Lorsque les deux groupements sont de part et d'autre du plan, la configuration est R,S et son image miroir S,R. Ceci constitue le second diastéréo-isomère. Lors de la synthèse de la bromadiolone, le diastéréo-isomère R,R – S,S est obtenu dans des proportions de l'ordre de 80 à 95%. On l'appelle donc le diastéréo-isomère majoritaire (Nahas, 1986). La structure semi développée de la molécule est présentée dans la Figure 10.

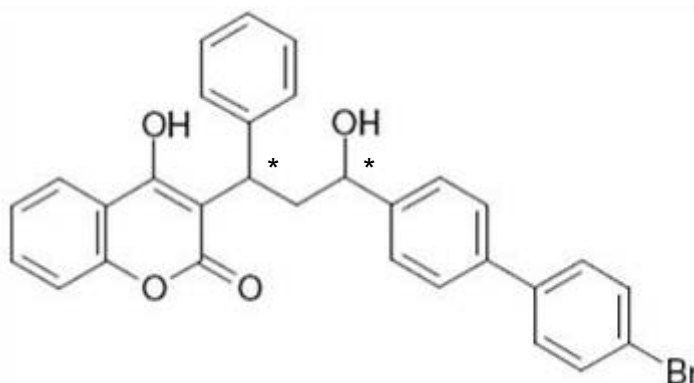


Figure 10. Structure semi-développée de la bromadiolone – C\* : carbone asymétrique (WHO, 1995).

### 3.3 Méthodes analytiques

Les propriétés physico-chimiques de chacun des anticoagulants diffèrent légèrement d'un composé à l'autre et constituent un intérêt pour l'identification du composé en toxicologie analytique, rendant possible leur dosage dans les produits biologiques. Un certain nombre de techniques analytiques pour la détermination d'anticoagulants dans les tissus animaux ont été décrits dans la littérature (Berny et al., 1995 ; Fauconnet et al., 1997 ; Meiser, 2005). Certaines concernent la détermination d'un seul composé par Chromatographie Liquide à Haute Performance et détection en Fluorescence (HPLC-FL) (O'Bryan et Constable, 1991) et leur métabolite (de Vries et Schmitz-Kummer, 1994) ou encore leurs énantiomères (Kelly et al., 1993 ; Naidong et al., 2001). La détection de plusieurs composés en même temps est basée sur des techniques HPLC (Feng et al., 1999 ; Guan et al., 1999), HPLC-FL (Hollinger et Pastoor, 1993), HPLC avec détection Ultra Violet (HPLC-UV) et FL (Kuijpers et al., 1995) HPLC-diode array detection (DAD) (Meiser 2005), HPLC-atmospheric pressure chemical ionization-avec détection en spectrométrie de masse (HPLC-APCI-MS) (Guan et al., 1999), ou encore HPLC-Electro Spray Ionisation et trap d'ion (HPLC-ESI-MS-Ion Trap) (Kollrose et Schober, 2002), LC-TDP-MS (de Vries et Schmitz-Kummer, 1994) ou Chromatographie Gazeuse (GC-MS) (Maurer et Arlt, 1998).

Concernant plus spécifiquement la bromadiolone dans les tissus animaux, les techniques analytiques qui étaient connues aux débuts de notre étude sont pour la plupart dérivées des travaux de Hunter (1983a ; 1983b ; 1985 ; Hunter et al., 1988). Il peut s'agir par exemple des techniques en Chromatographie liquide sur couche mince (HPTLC) (Berny et al., 1995) ou HPLC avec une sensibilité beaucoup plus importante (Berny et al., 1997 ; Giraudoux et al., 2006 ; Trémolières, 2003<sup>1</sup>). Les techniques pour la détection de la molécule dans d'autres matrices (sol, air, eau) sont pour la plupart issues de rapports confidentiels et n'ont jamais été publiées (Kemikalieinspektionen, 2006 ; USEPA, 1998 ; WHO, 1995). Et à notre connaissance, seul Giraudoux et al. (2006) avait alors dosé la molécule dans des appâts.

### **3.4 Persistance et comportement dans l'environnement**

La persistance de la bromadiolone a été étudiée dans des matrices de nature différente mais la plupart de ces travaux ont été réalisés en laboratoire. Le paragraphe suivant a pour but de synthétiser les résultats importants permettant de comprendre sa persistance et son comportement dans l'environnement tout en faisant le point sur les données manquantes qui permettraient de comprendre son transfert à travers les niveaux trophiques.

#### **3.4.1 Dans l'air**

La substance active n'est pas supposée être volatile et persister de façon significative dans l'air. Lors de son application dans des appâts, le risque pour une diffusion dans l'air est donc très faible (Kemikalieinspektionen, 2006).

#### **3.4.2 Dans les sols**

Dans les sols, les données disponibles rapportent des demi-vies à 12°C allant de 1,8 à 53 jours, l'absence d'information sur les sols utilisés ne permettant pas d'identifier d'éventuels facteurs de variation (AGRITOX INRA, 2004 ; Misra, 1995). Dans ces conditions, la dégradation de la bromadiolone conduit à la formation de métabolites qui restent non

---

<sup>1</sup> L'étude réalisée par Catherine Trémolières lors de sa thèse vétérinaire en 2003 a ensuite été publiée dans Giraudoux et al. (2006).

identifiés et persistent en quantité significative pendant au moins 1570 jours (Kemikalieinspektionen, 2006).

D'autre part, l'augmentation des pourcentages d'argile et/ou de matière organique diminuent la mobilité de la bromadiolone dans le sol (AGRITOX INRA, 2004 ; Spare et Olson, 1980). Elle est considérée comme « peu mobile » sur la base du système de classification SSLRC (Soil Survey and Land Research Centre) avec un coefficient d'absorption de carbone organique ( $K_{OC}$ ) compris entre 1563 et 1709 mL g<sup>-1</sup> (Kemikalieinspektionen, 2006). Les études de laboratoire concernant le lessivage sur colonne indiquent qu'il est peu probable que la substance active et ses potentiels métabolites, même s'ils sont introduits dans le sol, migrent à travers le profil pour atteindre les eaux de surface en quantité significative (Kemikalieinspektionen, 2006).

### **3.4.3 Dans l'eau**

Morin (1988) a déterminé à l'obscurité des demi-vies de 36 et 109 jours dans des solutions tampon à pH 4,32 et 9,09. Spare (1992) a démontré que la <sup>14</sup>C-bromadiolone est lentement hydrolysée dans une solution tampon à pH 5 avec une demi-vie de 392 jours (temps nécessaire pour que la quantité d'une substance contenue dans un système biologique soit diminuée de la moitié de sa valeur initiale) alors qu'aucune dégradation n'est observée à pH 7 et 9. Comme pour d'autres dérivés de l'hydroxycoumarine, les facteurs modifiant la vitesse d'hydrolyse de la bromadiolone en solution sont le pH, la salinité et la température (O'Neal et al., 1982).

Dans une solution aqueuse, la bromadiolone est rapidement et extensivement photolysée avec une demi-vie moyenne de 12,8 minutes à 25°C. La photolyse de la molécule conduit à la formation de dioxyde de carbone et de six produits de dégradation non identifiés (Kemikalieinspektionen, 2006). La tendance à s'adsorber sur les sédiments, combinée à un haut degré de photo-instabilité suggère qu'il est peu probable que la bromadiolone persiste dans l'eau de surface.

### **3.4.4 Dans les appâts**

Yuen (1994) a analysé des appâts par chromatographie liquide contaminés à 0,005% en difénacoum et brodifacoum (tous deux dérivés de l'hydroxy-4 coumarine). Lors de sa thèse de doctorat, M.F. Morin (1988) a analysé des appâts carotte contaminés à 0,01% de bromadiolone dans le but de connaître la concentration exacte qu'ils contenaient et d'évaluer le transfert de la molécule à la phase aqueuse. Mais à notre connaissance, très peu d'études

ont été réalisées de manière à déterminer la persistance dans le temps de la bromadiolone dans les appâts.

Si Grolleau (1998) a suggéré une dégradation rapide de la molécule dans les appâts carotte du fait de leur acidification lors de leur dégradation, seul Giraudoux et al. (2006) a étudié la persistance dans des conditions réalistes de la bromadiolone dans des appâts grains de blé utilisés en France depuis 1998 : cette étude, réalisée dans un seul sol et pendant 20 jours, a permis d'estimer la demi-vie de cette molécule dans les appâts à 5,6 jours. Cependant, nous l'avons vu, les conditions physicochimiques du milieu (humidité, acidité, température) sont susceptibles d'influencer la persistance de la molécule mais à notre connaissance, la variabilité de la persistance de la bromadiolone dans les appâts en fonction de ces facteurs environnementaux n'a pas été étudiée à ce jour.

D'autre part, les campagnols terrestres stockent de la nourriture dans leur terrier (Airoldi, 1976 ; Airoldi et al., 1976 ; Löschnig et Schechner, 1911 ; R. Defaut et C. Dornier com pers ; observations personnelles). Pouvant atteindre plusieurs centaines de grammes, ces réserves sont généralement formées de racines, rhizomes, bulbes, parfois de tiges ou de feuilles (Airoldi et al., 1976 ; R. Defaut et C. Dornier com pers, observations personnelles). Il a été observé que les appâts contenus dans les galeries artificielles pouvaient être mis en réserve, certaines réserves étant uniquement constituées de blé traité (R. Defaut et C. Dornier com pers, observations personnelles). Ces réserves sont façonnées par les rongeurs de façon à préserver leur contenu de l'humidité (Airoldi et al., 1976 ; observations personnelles). Ce mode de stockage des appâts empoisonnés n'a jamais été étudié à ce jour mais dès 1983, Grolleau soulignait la possible influence de la mise en réserve des appâts secs par les rongeurs sur la persistance de la bromadiolone et la cinétique d'intoxication des populations de campagnols.

### **3.5 Cinétique et métabolisme**

#### **3.5.1 Absorption et distribution**

L'absorption des anticoagulants est conditionnée par leurs caractéristiques de solubilité. Elle se fait principalement après ingestion mais aussi par résorption à travers la peau et le système respiratoire. Ces deux derniers modes d'absorption étant peu impliqués dans le transfert de la molécule à travers les niveaux trophiques, nous centrerons notre intérêt sur son absorption et sa distribution après ingestion. Après ingestion, l'absorption se fait principalement par diffusion passive au niveau des segments proximaux du tractus digestif. Des études sur des rats avec des molécules marquées administrées en solution de

diméthylsulphoxide (DMSO) par gavage ont montré que la bromadiolone était rapidement absorbée et détectable dans le plasma une heure après l'ingestion pour être maximale entre trois et six heures, et totale en 24 heures (Lipha, 1987).

Le transport sanguin des anticoagulants se fait, en partie, sous forme libre dans le plasma, mais surtout sous forme liée aux albumines plasmatiques avec un taux de fixation de 70% à 99% selon le produit considéré (>98.8% pour la bromadiolone) (Lipha, 1982). Cependant, les interactions entre les formes libres et liées sont encore mal connues (Deepa et Mishra, 2005).

Le foie est le principal organe d'accumulation des anticoagulants avec une concentration maximale observée dans les 9 heures qui suivent l'ingestion (Kemikalieinspektionen, 2006). Cette fixation hépatique est la caractéristique essentielle de leur distribution et le site récepteur hépatique commun aux coumariniques semble être similaire pour les indane-diones (Kolf-Clauw et al., 1995).

### **3.5.2 *Élimination et biotransformation***

L'élimination des anticoagulants dans le plasma est biphasique avec une première diminution des concentrations très rapide suivie d'une phase plus lente. Par exemple, la demi-vie de la bromadiolone dans le plasma de rats durant cette 1<sup>ère</sup> phase est de 9,5 heures puis de 5 jours en moyenne pour cette seconde phase (Kemikalieinspektionen, 2006). L'élimination dans le foie suit le même *pattern* mais cette fois-ci avec une persistance beaucoup plus longue (Figure 11). Par exemple chez le rat, pendant les 28 premiers jours qui suivent une administration orale de bromadiolone, le déclin des concentrations hépatiques est relativement rapide avec une demi-vie de 17 jours. La demi-vie durant la 2<sup>ème</sup> phase d'élimination est ensuite de 318 jours (Erickson et Urban, 2002).

Leur affinité pour les récepteurs hépatiques explique que la durée d'action des anticoagulants dépasse amplement la persistance plasmatique. Cette affinité étant plus marquée pour les composés les plus récents, cela se traduit par une persistance plus importante de ces composés dans l'organisme (Kolf-Clauw et al., 1995) et donc une action anticoagulante plus longue.

Les réactions de biotransformation et de détoxification sont variables en fonction du composé. Pour les composés de première génération, une faible partie du toxique ne subit aucune modification mais la majorité est métabolisée. La dégradation du coumafène chez le rat implique une hydroxylation (USEPA, 1998). Pour expliquer cette métabolisation, de nombreux travaux ont porté notamment sur l'implication de la famille enzymatique des cytochromes P-450 et plus particulièrement les CYP 2C9 puisque c'est par ailleurs la famille

d'enzymes qui réalise 90% de la métabolisation des principaux médicaments, et cela au niveau hépatique. Les anticoagulants, notamment le coumafène, sont très largement prescrits chez l'homme pour la prévention et le traitement des maladies thrombo-emboliques (Linder, 2001). De ce fait, les études *in vitro* du métabolisme des anticoagulants ont été principalement réalisés sur les dérivés coumariniques les plus utilisés en clinique notamment le coumafène et l'acénocoumarol (Thijssen et Ritzen, 2003). Peu d'études disponibles semblent concerner la toxicocinétique des anticoagulants spécifiquement utilisés en tant que rodenticide mais les SGARs tels que la bromadiolone, semblent quant à eux principalement excrétés inchangés (WHO, 1995).

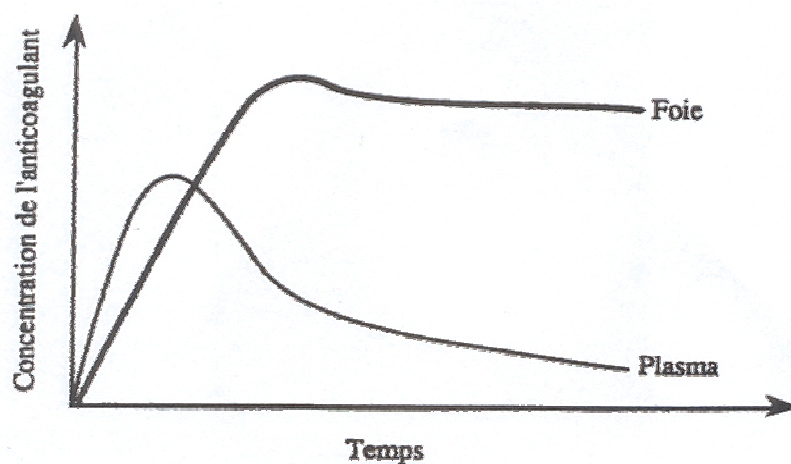


Figure 11. Représentation théorique des cinétiques plasmatiques et hépatiques des rodenticides anticoagulants chez le chien (Huguet, 1998).

### 3.5.3 Excrétion

Une grande proportion des composés ingérés est excrétée à travers les fèces. Selon Poché (1986), chez le rat, 53.3% de la bromadiolone est excrétée par voie biliaire dans les 2 jours et plus de 89% dans les quatre jours qui suivent l'ingestion de la molécule. Après leur transit au niveau intestinal, les anticoagulants peuvent subir un cycle entéro-hépatique et être ainsi réabsorbés dans le sang (WHO, 1995). Ceci pourrait ainsi contribuer, en plus de la persistance hépatique, à l'action relativement longue des anticoagulants (Huguet, 1998). Les phénomènes de coprophagie peuvent aussi induire une réabsorption des anticoagulants excrétés dans les fèces. Aucune excrétion de bromadiolone n'a été constatée dans l'air expiré et très peu de bromadiolone est éliminée dans les urines (0.86% de la dose ingérée au bout de 48 heures) (Poché, 1986). En précision aux données du WHO (1995) citées cidessus, chez le rat, l'analyse de molécules marquées dans les fèces et dans des extraits de tube digestif a montré qu'environ 22% de la radioactivité totale était retrouvée sous forme de bromadiolone inchangée dans les fèces et 6% dans le tube digestif alors que 15% de la dose totale était retrouvée sous forme d'un métabolite dans les fèces et 4% dans les extraits

de tube digestif. Ce métabolite majeur a été identifié comme une forme hydroxylés de la molécule parent (Kemikalieinspektionen, 2006).

### **3.5.4 Persistance dans les tissus**

Deux études ont été conduites sur la bioconcentration dans les tissus de poisson en condition de laboratoire. Le maximum du facteur de bioconcentration pour la bromadiolone chez la Perche soleil bleue a été déterminé à 460 pour la totalité du corps. Dans une seconde étude portant sur le poisson chat, le facteur de bioconcentration dans la totalité du corps était compris entre 24 pour le 1<sup>er</sup> jour à 74 pour le 14<sup>ème</sup> jour d'exposition. L'assimilation de molécules marquées radioactivement a été rapide et atteint un état de plateau après approximativement une semaine d'exposition. Pour comparaison, le facteur de bioaccumulation estimé à partir du log  $K_{OW}$  est 575. Lors d'une exposition constante d'une durée d'au moins 6 jours, la bromadiolone a de ce fait un potentiel faible à modéré d'accumulation dans les tissus de poisson (Kemikalieinspektionen, 2006).

A notre connaissance, seuls Deley et Joseph (1985) et Giraudoux et al. (2006) ont étudié les résidus de bromadiolone dans les tissus de rongeurs en conditions naturelles. Deley et Joseph (1985) ont mesuré les résidus dans des campagnols terrestres exposés à des appâts contenant 140 mg de bromadiolone par kg pendant trois jours après un traitement. Les concentrations mesurées dans la totalité du corps atteignaient alors 0,91 mg kg<sup>-1</sup> en moyenne. Giraudoux et al. (2006) ont montré que les résidus de bromadiolone dans une population de Campagnol terrestre restaient stables pendant 10 jours après le traitement et ont conclu que de tels niveaux de résidus dans les rongeurs pouvaient conduire à des doses journalières ingérées par des prédateurs supérieures à la DL<sub>50</sub> (dose létale pour que 50% des individus d'une population exposée meurt) pour différentes espèces vertébrées. Cependant, aucune donnée n'est pour l'instant disponible sur des durées plus longues.

## **3.6 Mécanisme d'action**

Les anticoagulants agissent par analogies structurales de la vitamine K. Ils empêchent la synthèse de différents facteurs de coagulation et s'opposent à la synthèse hépatique de la prothrombine. Les mécanismes de la coagulation sont perturbés provoquant ainsi une mort différée de l'animal par hémorragie (Grand, 1976 ; Pelfrene, 1991). Dans un premier temps, nous réaliserons un rappel nécessaire à la compréhension de la toxicité de ces molécules sur les mécanismes de l'hémostase. Ensuite nous décrirons plus précisément



les mécanismes d'action des anticoagulants en comprenant comment ils interviennent en bloquant le cycle de la vitamine K.

### **3.6.1            *Rappel sur l'hémostase***

L'hémostase constitue l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir la circulation du sang dans le système vasculaire assurant la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas de rupture de la continuité de la paroi vasculaire tout en évitant la formation d'obstacle à la circulation. Nous distinguerons schématiquement trois mécanismes majeurs et successifs (Jain 1993 ; Lewis 1996) :

**1. l'hémostase primaire**, correspondant à la formation du thrombus plaquettaire ou « thrombus blanc ». Elle comprend :

- un temps vasculaire, qui correspond à une vasoconstriction réflexe et immédiate du vaisseau lésé d'où une réduction de diamètre de sa lumière, avec également l'activation des plaquettes par leur mise en contact avec le sous-endothélium du vaisseau lésé.
- un temps plaquettaire. Ce dernier aboutit à la formation du clou plaquettaire, obstruant de manière provisoire la brèche vasculaire, grâce à l'intervention de facteurs plasmatiques qui font les intermédiaires entre la brèche et les plaquettes. Ces facteurs sont les facteurs de von Willebrand ou facteur VII permettant une adhésion des plaquettes sur la lésion, et le fibrinogène permettant d'accrocher les plaquettes les unes aux autres.

**2. l'hémostase secondaire** ou coagulation, aboutissant à la formation d'un caillot sanguin qui est dû à l'apparition de filaments très solides de fibrine emprisonnant les hématies. La transformation du fibrinogène en fibrine insoluble permet donc de former le caillot. La coagulation met en jeu une cascade de réactions enzymatiques. Il existe deux voies d'activation de la coagulation :

- une voie endogène (intrinsèque) ne faisant intervenir que des facteurs plasmatiques, dont le premier est activé au contact du sous-endothélium vasculaire,
- et une voie exogène (extrinsèque) nécessitant le passage dans le sang d'un facteur tissulaire, libéré par la destruction des cellules endothéliales suite à une brèche.

Les deux voies se rejoignent et deviennent communes par l'activation d'une protéine commune : le facteur X ou de Stuart. C'est à l'issue de cette voie commune que se forme la fibrine. Au final, plus d'une douzaine de protéines interagissent dans une cascade ordonnée d'activations. A chaque étape, un précurseur inactif d'un facteur de coagulation subit une réaction protéolytique limitée et devient lui-même une protéase qui active de la même façon

son successeur, jusqu'à la formation ultime de fibrine insoluble et stable. A l'exception des facteurs III, IV, VIIIc, tous les facteurs sont synthétisés par le foie. Parmi eux, quatre sont des facteurs « vitamine K dépendant » (Shearer, 1990). Il s'agit des facteurs PPSB avec le facteur II (Prothrombine), VII (Proconvertine), IX (la globuline anti-hémophilique B) et X (facteur de Stuart-Prower). L'absence d'activation de ces facteurs de coagulation rend impossible ou ralentit la voie endogène et la voie exogène de la coagulation d'où l'apparition d'hémorragies (Kolf-Clauw et al., 1995 ; Whitlon et al., 1978). La Figure 12 récapitule les différentes étapes de l'hémostase secondaire.

**3. la fibrinolyse**, faisant intervenir là aussi des facteurs plasmatiques consistant à dégrader la fibrine insoluble grâce à une enzyme très puissante, la plasmine, et aboutissant à la lyse du caillot et à la restitution *ad integrum* de la paroi vasculaire.

La production des facteurs de la coagulation « vitamine K dépendant » est donc incontournable afin que le mécanisme de la coagulation puisse se mettre en place correctement. Le cycle de la vitamine K ainsi que les apports exogènes de la vitamine K sont de ce fait indispensables à l'équilibre hémostatique ainsi qu'au bon fonctionnement général de l'organisme.

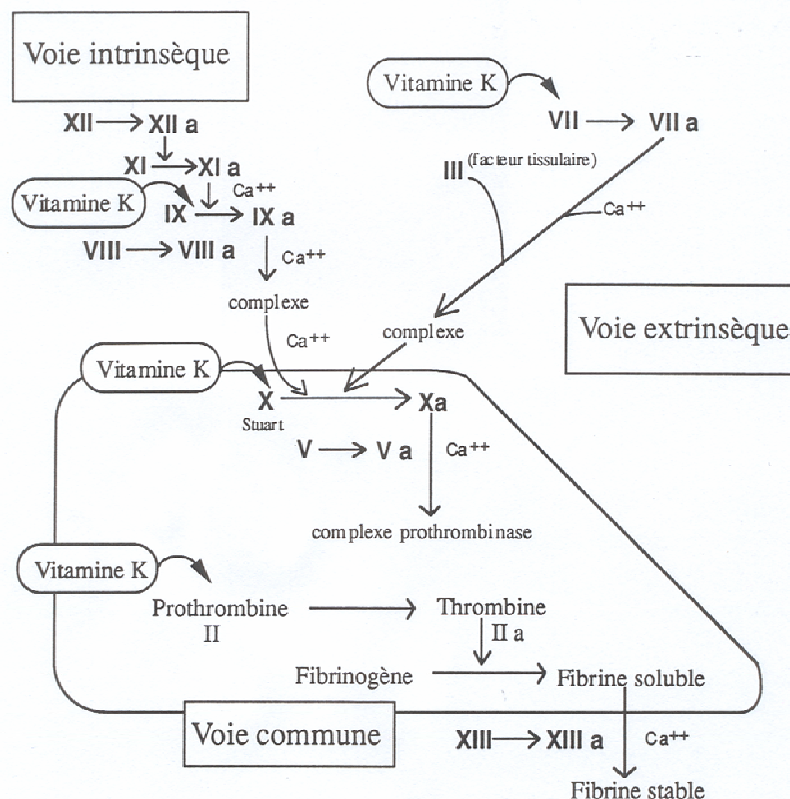


Figure 12. Schéma global récapitulant la cascade d'activation des facteurs de la coagulation permettant l'hémostase secondaire. Les voies extrinsèques et intrinsèques, empruntées pour la mise en place du mécanisme commun de l'hémostase, sont ici distinguées. Les facteurs activés sont symbolisés par le numéro du facteur suivi de la lettre a (Vermeer, 1984)

### **3.6.2 Cycle de la vitamine K et action des anticoagulants**

Dans le processus de coagulation, la vitamine K est nécessaire à la synthèse des facteurs pro-coagulants (PPSB) ainsi que des deux inhibiteurs de la coagulation (Protéines C et S) (Stafford, 2005).

Dans une première étape, la synthèse de ces protéines pro/anticoagulantes est réalisée dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. Cette synthèse conduit à des précurseurs biologiquement inactifs des facteurs de coagulation (Wallin et Hutson, 2004).

Dans une seconde étape, la vitamine K est nécessaire à la carboxylation post-traductionnelle des résidus glutamate de ces facteurs pour les transformer en acides  $\gamma$ carboxy-glutamiques qui seront actifs (Figure 13). Ces résidus sont des diacides de types  $[R-C-(COOH)_2]$  qui forment des sites de liaison au calcium qui leur permettent d'adhérer aux plaquettes via leurs phospholipides membranaires. Sans cette adhésion aux plaquettes, la cascade de la coagulation serait très faible car l'activation des proenzymes en enzymes est très lente. En effet, l'adhésion des facteurs de la coagulation aux plaquettes concentre les activités enzymatiques, ce qui permet l'amplification phénoménale du signal moléculaire initial. Sans activation massive de ces proenzymes, la formation du caillot serait trop lente pour colmater une brèche vasculaire (Wallin et Huston, 2004). Cette carboxylation s'effectue en présence d'oxygène, de dioxyde de carbone et de vitamine K réduite ( $KH_2$ ). La vitamine K réduite est oxydée au cours de la réaction (Figure 13). La quantité de vitamine K apportée par l'alimentation étant limitée, il est impératif de recycler cette vitamine K époxyde en vitamine K réduite et c'est cette réaction qu'accomplit la Vitamine K Epoxyde Réductase ou VKOR. La carboxylation post-traductionnelle des résidus glutamate des facteurs PPSB et des protéines S et C ont été notamment décrites par Lin et al. (2002), Presnell et Stafford (2002) et Furie et Furie (1990), mais ne sera pas détaillée ici.

Les anticoagulants dont la bromadiolone sont des inhibiteurs de ce complexe enzymatique et bloquent ainsi le cycle de la Vitamine K. En présence d'anticoagulants, les facteurs de coagulation ne peuvent plus être carboxylés ce qui rend leur activation impossible. Ils sont toujours synthétisés mais la concentration plasmatique de leur forme active diminue. L'absence de  $\gamma$  carboxylation fait perdre aux cinq proenzymes de la cascade de la coagulation leur capacité d'adhérer à la surface des plaquettes sanguines. Par conséquent la coagulation est perturbée voire stoppée lorsque les stocks de Vitamine K réduite et de facteurs de coagulation activés de l'organisme sont épuisés. La demi-vie de ces facteurs varie de 8 à 45 heures expliquant une apparition des symptômes hémorragiques différée par rapport à l'ingestion. Les microlésions capillaires provoquent des hémorragies qui en raison de l'absence de prothrombine (Figure 13), ne s'arrêtent jamais. L'animal meurt

alors des suites d'hémorragies entre 2 et 10 jours après l'ingestion du produit (Grolleau et al., 1989; USEPA, 1998).

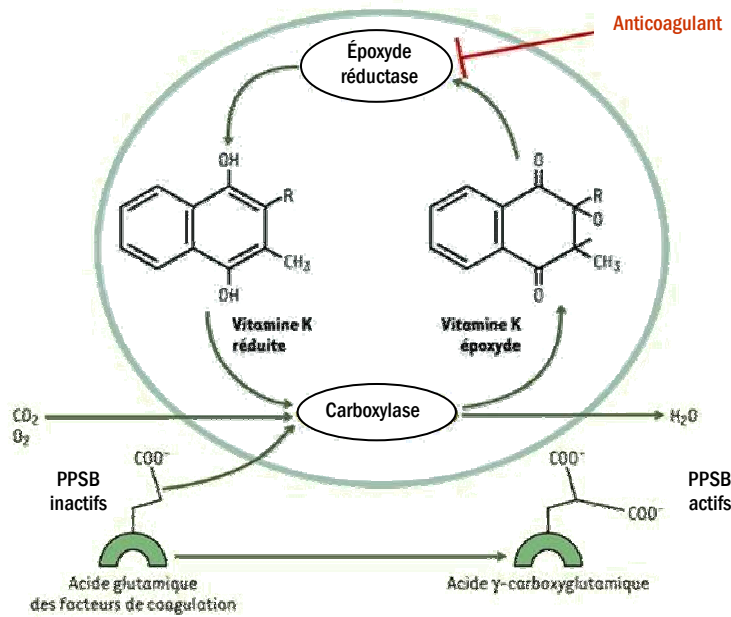


Figure 13. Cycle de la vitamine K montrant la réaction de carboxylation couplée à l'oxydation de la vitamine K pour l'activation de l'acide glutamique terminal des facteurs de coagulation vitamine K dépendants (Le Bonniec, 2004). L'action des anticoagulants à travers l'inhibition de la VKOR époxyde réductase est symbolisée par une flèche.

### 3.6.3 Traitement antidotique

Lors d'intoxication d'animaux domestiques par les anticoagulants, un traitement antidotique efficace existe et consiste en l'injection de vitamine K1 ou phytoménadione. Le traitement d'attaque se fait le plus souvent à la posologie de 5mg.kg<sup>-1</sup> une à deux fois à 12 heures d'intervalle, par voie intraveineuse ou intrarectale dans le cas de chiot, de chatons ou d'hypovolémie par exemple (Kolf-Clauw et al., 1995 ; Pouliquen, 2001). Les injections intramusculaires ou sous-cutanées sont, en revanche, à proscrire car il peut y avoir formation d'un hématome, qui empêchera la résorption de la vitamine K1. La vitamine de synthèse K3 doit être proscrite, particulièrement en cas d'urgence, car elle n'agit ni aussi rapidement (nécessité de bioactivation hépatothique), ni aussi durablement que la vitamine K1 (Kolf-Clauw et al., 1995 ; Pouliquen, 2001).

### 3.7 Toxicité de la bromadiolone

#### 3.7.1 Sensibilité de différentes espèces

Du fait d'une grande variabilité de sensibilité aux anticoagulants, l'exposition et le risque sont différents en fonction des différents groupes d'espèces (Kemikalieinspektionen, 2006). Cela semble dû en grande partie aux différences de toxicocinétique et d'affinité avec le site de fixation de la cible moléculaire (Petterino et Paolo, 2001). Sur la base des données de mortalités observées en laboratoire, du temps de rétention dans le foie et dans le plasma, les anticoagulants de seconde génération tels que la bromadiolone sont classés par Erickson et Urban (2002) comme très hautement toxiques pour les mammifères, hautement à très hautement toxiques pour les oiseaux et de modérément à très hautement toxiques pour les organismes aquatiques. Tous les anticoagulants coumariniques sont assez toxiques après administration unique pour les rongeurs sensibles, avec des doses létales de l'ordre du  $\text{mg kg}^{-1}$  (USEPA, 1998). Si la base de données AGRITOX INRA (2004) et l'USEPA (1998) fournissent des valeurs de  $\text{DL}_{50}$  pour de nombreuses espèces (rat, souris, lapin, chien, coyote, chat, furet, poisson chat, truite arc en ciel, daphnie) (Table 2), aucune valeur n'est disponible pour les prédateurs européens se nourrissant de rongeurs en nature (renard, buse, hermine...).

	Espèce	$\text{DL}_{50}$ ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	Référence
Oiseaux	Colin de virginie ( <i>Colinus virginianus</i> )	170 ou 138	USEPA, 1998
	Caille	1600	WHO, 1995
Mammifères	Rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	0,56 – 0,84	USEPA, 1998
	Souris ( <i>Mus musculus</i> )	1,75	AGRITOX INRA, 2004
	Lapin	1	WHO, 1995
	Chien (beagle)	10	USEPA, 1998
	Chat	25	USEPA, 1998
	Furet	9,8	Poché, 1988
	Coyote	Environ 10	Poché, 1988

Table 2. Données de toxicité aiguë en ingestion unique de la bromadiolone administrée par voie orale disponibles dans la littérature pour les vertébrés terrestres.

### 3.7.2 Une toxicité accrue par ingestion répétée

Les anticoagulants et particulièrement les SGARs ont la propriété d'être beaucoup plus toxiques lors d'ingestions répétées. Par exemple, la comparaison de DL<sub>50</sub> de la bromadiolone chez le chien et le rat est présentée dans la Table 3. La bromadiolone peut, dans le cas d'une intoxication chronique, s'avérer létale à très faible dose, par exemple, l'ingestion de 0,020 mg kg<sup>-1</sup> jour<sup>-1</sup> chez des chiens a provoqué leur mort après 64 à 85 jours d'administration (Kemikalieinspektionen, 2006)

Espèce	DL <sub>50</sub> en une seule ingestion (mg kg <sup>-1</sup> )	DL <sub>50</sub> en une ingestion par jour pendant 5 jours (mg kg <sup>-1</sup> jour)	Plus petite dose létale par jour pendant 5 jours (mg kg <sup>-1</sup> jour)
Chien (beagle)	10 (USEPA, 1998)	0,5 (Petterino et Paolo, 2001)	0,150 (Kolf-Clauw et al., 1995)
Rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	0,56 – 0,84 (USEPA, 1998)	0,12 – 0,07 (USEPA, 1998)	/

Table 3. Comparaison entre les données de toxicité aiguë par ingestion unique et celles par ingestion répétée pendant 5 jours pour le chien et le rat.

## 4. Méthodes actuelles d'évaluation du transfert de la bromadiolone à travers les réseaux trophiques

### 4.1 Etudes de toxicité en captivité

Jusqu'à présent, la plupart des études réalisées sur le risque d'empoisonnement encouru par des prédateurs se nourrissant de proies intoxiquées ont été menées en laboratoire sur des animaux captifs. Par exemple Lund et Rasmussen (1986) ont intoxiqué quatre fouines (*Martes foina*) avec des Mulots à collier (*Apodemus flavicollis*) ayant consommé un appât à 0,005% de bromadiolone. Les fouines ont reçu huit mulots par jour pendant un jour pour les deux premières et quatre jours pour les deux autres. Les mulots avaient consommé de l'appât durant quatre jours avant d'être sacrifiés et congelés, puis offerts le lendemain et les jours suivants. Les fouines ne présentèrent aucun symptôme d'intoxication ni d'hémorragies internes à l'autopsie après leur euthanasie trois semaines plus tard. Grolleau et al. (1989) a quant à lui prédit un faible risque de mortalité pour des hermines et buses variables nourries avec des Campagnols terrestres euthanasiés entre 24 et 72 heures après leur avoir offert des appâts carotte à 0,01% de bromadiolone. Sans être

élevé, le risque de mortalité n'était pas nul puisque certaines hermines ont présenté des signes d'intoxication (apathie, consommation alimentaire quasi nulle) dans les jours suivant l'exposition mais toutes ont survécu. Selon cette même étude, le risque pour la buse est lui aussi resté faible puisque seules deux buses sur vingt ayant reçu pendant trois jours un campagnol exposé à des appâts empoisonnés n'ont pas survécues.

Cependant, ces travaux toxicologiques de laboratoire ont montré leur insuffisance dans la prédiction des effets de traitements en grandeur réelle (European Commission, 2002). Par exemple, bien que, dès 1983, Grolleau soulignait la possible influence de la mise en réserve des appâts par les rongeurs sur la persistance de la bromadiolone et la cinétique d'intoxication des populations de campagnols, ce comportement spécifique n'a jamais été pris en compte dans ces études en captivité. Il est par ailleurs impossible en captivité d'intégrer la dégradabilité de la molécule et les échelles spatiales et temporelles auxquelles cette variabilité s'exprime. Les études en captivité permettent par exemple la mise en évidence de relations de causalité entre la présence de pesticides dans l'environnement et leurs effets biologiques (Aubertot et al., 2005). Par contre, elles ne prennent pas en compte les variations de conditions climatiques par exemple ou d'autres phénomènes qui peuvent s'ajouter en nature. Pour toutes ces raisons, les résultats toxicologiques des années 80-90 portant sur les effets de la bromadiolone sur différentes espèces n'ont pas permis de prévoir les dégâts sur faune non-cible observés dans les secteurs traités (Grolleau et al., 1989).

### **4.2 Modélisation du transfert**

Plusieurs études ont jusqu'à présent été réalisées de manière à modéliser le taux de transfert des anticoagulants à travers les niveaux trophiques. Nous pouvons citer notamment le scénario de Lodal et Hansen (2002) qui fournit de bonnes bases concernant l'exposition directe et indirecte de la faune non cible. Par exemple, cette étude prend en compte le mode de traitement de par la nature de l'appât (e.g. céréales, blocs de parafine, concentrat liquide...) de manière à déterminer le risque pour les espèces non cibles dans l'environnement et aussi fournir une évaluation de l'exposition humaine à travers divers scénari. Le modèle probabiliste développé par Giddings et al. (2005) ou Giddings et al. (2006) permet quant à lui d'estimer la concentration de rodenticide dans les corps de prédateurs et charognards susceptibles d'ingérer des proies contaminées. Ce dernier modèle estime la dose journalière de rodenticide ingérée pendant une période de 90 jours suivant un traitement comme une fonction de la quantité de nourriture ingérée par l'animal, de la fraction de rongeurs qui a été exposée aux rodenticides dans la zone traitée, des résidus de rodenticide contenus dans les tissus des rongeurs et de la cinétique de

dépuration du rodenticide chez les prédateurs. Cependant, la quantification de nombreux de ces paramètres est difficile du fait d'incertitudes ou d'un manque d'information sur ceux-ci et conduit à un risque estimé incertain. Seules des études *in situ* permettent d'extraire les données nécessaires à l'ajustement de ce type de modèle (Lodal et Hansen, 2002). La prise en compte des facteurs biologiques influençant cette accumulation de contaminants à tous les niveaux trophiques est donc indispensable pour évaluer le risque. De manière à prédire les transferts trophiques de contaminants et leur évolution temporelle, il est nécessaire de tenir compte à la fois de la cinétique d'accumulation et de persistance des substances toxiques à l'échelle des organismes mais aussi des transferts au niveau des populations. Ces études de modélisation soulignent que pour comprendre, modéliser et évaluer les conséquences d'opérations de contrôle des populations de rongeurs, il est nécessaire d'avoir une connaissance approfondie de l'écologie, du comportement, des habitudes alimentaires etc. des animaux dans la zone géographique concernée. Cependant, plus une représentativité élevée va être recherchée et moins ces études seront facilement réalisables et transférables en d'autres temps et lieux.

### **4.3 Evaluation de l'exposition en nature - vers une utilisation de « marqueurs indirects »**

Le risque écologique encouru par les prédateurs dépend non seulement de la toxicité de la molécule et de ses métabolites mais est aussi fonction de l'exposition au pesticide.

Pour des raisons éthiques et pratiques, les méthodes appliquées à la mesure de l'exposition des populations de vertébrés terrestres non cibles aux pesticides doivent rester non invasives tout en étant applicables à large échelle. Actuellement, aucune méthode non invasive n'est disponible pour mesurer l'exposition de prédateurs en nature à la bromadiolone ou à d'autres anticoagulants, efficacement et précisément sur une large échelle. Les biomarqueurs non létaux principalement utilisés pour mesurer l'exposition d'espèces domestiques tels que les temps de coagulation ou l'analyse de la bromadiolone dans le plasma (Boermans et al., 1991 ; Mount, 1988) nécessitent de capturer les animaux ce qui rend virtuellement impossible les études *in situ* pour des vertébrés comme des rapaces ou des renards à de larges échelles. De ce fait, l'analyse des tissus de cadavres collectés sur le terrain par les réseaux de surveillance de la faune sauvage est actuellement la seule méthode disponible pour déterminer le niveau d'exposition des prédateurs aux SGARs (e.g. Alterio, 1996 ; Alterio et al., 1997 ; Barnett et al., 2006 ; Berny et al., 1997 ; Brown et al., 1998 ; Eason et al., 1999 ; Eason et Spurr, 1995 ; Fournier-Chambrillon et al., 2004 ; McDonald et al., 1998 ; Murphy et al., 1998 ; Shore et al., 2003 ; Walker et al., 2008). Cependant, la recherche de carcasses a un faible succès de réussite notamment du fait que



des prédateurs et charognards peuvent se nourrir de ces carcasses et de la difficulté de détecter des animaux morts en nature (Howald et al., 1999). La probabilité de découvrir un cadavre est notamment fonction de la taille de l'espèce, de la couleur du plumage ou de la fourrure, du nombre d'individus morts, de l'activité des nécrophages, de la fréquentation des sites par des observateurs... De ce fait, l'impact des empoisonnements de la faune non cible suite aux traitements aux anticoagulants peut être sous-estimé et est seulement évalué après l'observation de mortalité importante en nature. Il devient donc urgent de développer d'autres moyens de mesurer l'exposition non létale et mesurable aux échelles spatiales pertinentes des populations non cibles aux anticoagulants.

Une alternative possible serait d'incorporer une « molécule traçante » appropriée (European Commission, 2002) telle que le Rhodamine B ou la Tétracycline dans les appâts administrés aux campagnols que l'on pourrait retrouver dans les réjections (fèces, pelotes) ou dans les poils de prédateurs. Ce genre d'approche a déjà été réalisé dans d'autres contextes (Fisher, 1999 ; Morriss et al., 2005 ; Ogilvie et Eason, 1998 ; Papillon et al., 2002 ; Spurr, 2002a, b). Cependant, cela nécessiterait alors que tous les appâts distribués par les agriculteurs contiennent cette molécule qui ne devra pas présenter de toxicité supplémentaire pour les animaux et l'environnement, et devra présenter une persistance similaire à celle de la bromadiolone dans les appâts et les espèces cibles.

D'après la littérature, les résidus d'autres hydroxycoumarines (Flocoumafen, Brodifacoum et Difénacoum) sont mesurables dans des pelotes de régurgitation d'Éffraie des clochers *Tyto alba* (Eadsforth et al., 1991 ; Gray et al., 1994 ; Newton et al., 1994). Par exemple, 29% du brodifacoum ingéré peut être retrouvé dans les pelotes. Nous avons vu que la principale voie d'excrétion de la bromadiolone chez un mammifère tel que le rat était les fèces. Nous pouvons donc supposer que, de manière similaire, l'analyse de la bromadiolone excrétée dans les fèces pourrait être utilisée comme méthode non invasive pour mesurer l'exposition de prédateurs tels que le renard. Ce type d'évaluation populationnelle de l'exposition par un échantillonnage de fèces de renard en nature permet actuellement de mesurer la contamination de l'environnement par un cestode parasite, *Echinococcus multilocularis*, responsable d'une maladie létale chez l'homme, l'Echinococcose alvéolaire (Raoul et al., 2001 ; Raoul et al., 2003). Il devrait pouvoir être possible de l'adapter à notre problématique de contamination des niveaux trophiques à la bromadiolone. Par exemple, la fraction de fèces positives récoltées en nature pourrait alors être indicatrice de l'exposition de la population.

## 5. En résumé

Du fait de l'inexorable croissance des causes et de l'importance des pollutions par des substances toxiques, nous sommes contraints de mieux connaître les modalités de dispersion et de circulation des polluants dans l'environnement, les mécanismes par lesquels ils contaminent les êtres vivants, les niveaux de concentration qu'ils atteignent dans la biomasse et enfin les conséquences qui en résultent pour la santé des écosystèmes affectés et l'importance de leur impact sur la production des ressources naturelles. Nous l'avons vu, modéliser le transfert à travers les niveaux trophiques est beaucoup trop incertain devant la variabilité des facteurs naturels pouvant rentrer en compte, et semble peu pertinent sans données précises de terrain. Il est de ce fait nécessaire que notre étude soit à la fois centrée sur deux démarches appliquées de l'écotoxicologie : (1) le suivi, *monitoring*, des polluants dans l'environnement et (2) la prévision des effets potentiels des polluants et donc de l'évaluation du risque chimique.

Afin de contribuer à une meilleure connaissance des processus de transfert des anticoagulants dans les écosystèmes par l'intermédiaire d'une méthode de mesure de l'exposition des populations de prédateurs en nature, des approches complémentaires propres à l'écotoxicologie devront être mises en place. Cette complémentarité devra s'exprimer vis-à-vis du niveau d'organisation biologique concerné (échelle individuelle et populationnelle) et vis-à-vis de la complexité du système étudié (approche holistique et réductionniste) (Ramade, 2007).

Jusqu'à présent les études centrées sur le transfert des pesticides et plus particulièrement des anticoagulants étaient principalement rétrospectives avec une approche *a posteriori* : un effet est-il observable et quelle est son origine. En accord avec Calow (1996), nous nous efforcerons d'orienter notre étude de manière à mettre en place une approche prédictive, ou *a priori* : est-il envisageable que l'on constate des effets avec des conséquences significatives sur l'écosystème ? Cela permettrait notamment d'établir et de prévoir le comportement vraisemblable et les effets prévisibles d'un pesticide tel que la bromadiolone dans l'écosystème.

L'estimation de l'exposition secondaire des prédateurs aux anticoagulants doit prendre en considération la quantité de résidus disponibles dans les tissus des campagnols (Erickson et Urban, 2002) qui est elle-même liée à la persistance de la matière active dans les appâts utilisés en champs. Les taux de résidus disponibles dans le corps des rongeurs sont en effet proportionnels en partie à la concentration en matière active des appâts et au temps d'exposition (Grolleau et al., 1989 ; Merson et al., 1984). Nous l'avons vu, jusqu'à présent, la majorité des données disponibles sur la persistance de la bromadiolone dans

l'environnement et notamment dans le sol et les tissus de campagnols provenaient d'études réalisées en laboratoire (AGRITOX, 2004 ; Misra, 1995 ; Spare et Olson, 1980), dans des conditions artificielles ne prenant pas en compte ni les pratiques réelles de traitements, ni l'ensemble des facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la persistance. La Direction Générale pour l'Agriculture de la Commission Européenne (2000) recommande de compléter ces données obtenues en laboratoire par des études menées en nature et en conditions réelles d'utilisation. Dans les conditions réalistes de traitement, à notre connaissance, seul Giraudoux et al. (2006) a étudié la persistance de la bromadiolone, dans des appâts utilisés en France depuis 1998. Cette étude a été réalisée dans un seul sol et pendant 20 jours. Cependant, nous l'avons vu, de nombreux paramètres peuvent influencer la persistance des pesticides dans l'environnement. Il apparaît de ce fait nécessaire d'évaluer si les facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques, les caractéristiques physicochimiques et topographiques des sols de même que le comportement de stockage des appâts par les rongeurs peuvent influencer cette persistance dans les appâts.

Dans cette même étude, Giraudoux et al. (2006) avait montré une stabilité des résidus de bromadiolone mesurés dans les tissus des rongeurs cibles pendant les 10 premiers jours qui suivent le traitement. Aucune étude n'a jusqu'à présent été réalisée sur une durée plus longue qui tienne compte de la persistance de la molécule dans les réserves d'appâts constituées par les rongeurs, ni même sur les autres espèces de rongeurs présentes sur les parcelles traitées qui sont elles aussi susceptibles d'être capturées par les prédateurs.

Bien que des prédateurs tels que le renard puissent être exposés, la toxicodynamique et la toxicocinétique de la bromadiolone chez cette espèce restent inconnues (AGRITOX INRA, 2004 ; Erickson et Urban, 2002 ; Giraudoux et al., 2006 ; Kupper et al., 2006 ; USEPA, 1998). Malheureusement, l'importante mortalité de cette espèce en nature reste à ce jour peu comprise. Nous avons vu qu'il n'existe à notre connaissance aucune méthode de suivie d'intoxication non-létale des prédateurs de campagnols facile à mettre en œuvre et opérationnelle en nature à l'échelle de toute une population. Eadsforth et al. (1991); Gray et al. (1994), et Newton et al. (1994) ont montré que l'analyse de résidus d'autres SGARs que la bromadiolone dans des pelotes de régurgitation d'Effraie des clochers pouvait être utilisée pour le suivi de leur exposition. Nous pouvons supposer que de manière similaire l'analyse de résidus de bromadiolone dans les fèces pourrait être utilisée comme méthode non invasive pour suivre l'exposition en nature de prédateurs tels que le renard.

## **D. Définition des objectifs**

L'objectif de nos travaux a été de comprendre les facteurs qui contrôlent le transfert de la bromadiolone dans l'écosystème et de déterminer dans quelle mesure les caractéristiques environnementales, biologiques, physiologiques et écologiques des organismes peuvent moduler le transfert de cette substance chimique dans la chaîne alimentaire appâts/sols – campagnols de prairie - renard. Pour cela, trois axes d'approche ont été définis.

### **1. AXE 1 : Persistance de la bromadiolone dans les appâts *in situ***

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à répondre à la question suivante :

**Quelle est la variabilité environnementale de la persistance de la bromadiolone dans les appâts « grains de blé » lors des opérations de contrôles des populations de Campagnol terrestre ?**

Par conséquent, nous pouvons nous interroger sur les trois points suivants :

1. Est-ce que la persistance de la bromadiolone dépend des caractéristiques physico-chimiques et topographiques des sols dans lesquels les appâts sont distribués ?
2. Est-ce que la persistance de la bromadiolone dépend des conditions météorologiques des stations où les appâts sont distribués ?
3. Est-ce que la persistance de la bromadiolone dépend de l'éventuel stockage des appâts par les campagnols ?

### **2. AXE 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement**

Dans un second temps, à partir des résultats obtenus précédemment portant sur la persistance de la molécule dans les appâts, nous nous sommes intéressés à l'évolution temporelle des résidus de bromadiolone dans les populations de rongeurs susceptibles d'être disponibles pour les prédateurs au cours du temps. Nous avons orienté nos travaux de manière à répondre à la question suivante :

### **Comment la quantité de résidus de bromadiolone contenus dans les tissus des rongeurs suite à un traitement évolue-t-elle au cours du temps à l'échelle populationnelle ?**

Par conséquent, nous pouvons nous interroger sur les quatre points suivants :

1. Combien de temps après un traitement les résidus de bromadiolone sont-ils maximum dans les populations de rongeurs présents sur une parcelle traitée ?
2. Pendant combien de temps après un traitement les prédateurs sont-ils susceptibles d'ingérer de la bromadiolone en se nourrissant de rongeurs ?
3. Est-ce que d'autres paramètres physiologiques ou écologiques tels que la distribution des résidus dans le corps des rongeurs, leurs traits d'histoire de vie ou le comportement des différentes espèces intoxiquées peuvent influencer la part de bromadiolone disponible pour les prédateurs ?
4. Est-ce que des individus recolonisant une parcelle plusieurs mois après le traitement peuvent s'intoxiquer à leur tour ?

### **3. AXE 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?**

Enfin, avant de pouvoir déterminer quels paramètres environnementaux pouvaient influencer l'exposition des populations de renard en nature comme cela a été réalisé pour les deux premiers axes pour les appâts et les populations de rongeurs, il était indispensable de développer une méthode de mesure indirecte et non invasive de l'exposition des populations de renard applicable à large échelle. Pour cela, à partir des résultats des études menées précédemment, nous nous sommes attachés à répondre à la question suivante :

#### **De par la collecte et l'analyse des résidus de bromadiolone contenus dans les fèces de renard, est-il possible d'évaluer l'exposition des prédateurs en nature?**

Par conséquent, nous pouvons nous interroger sur les quatre points suivants :

1. Est-ce qu'un renard se nourrissant en captivité de campagnols intoxiqués excrète de la bromadiolone dans ses fèces ?
2. Si oui, est-il possible en captivité de la mesurer précisément et d'établir une relation entre la quantité de résidus mesurés et les signes cliniques développés par le renard ?
3. Est-il possible de mesurer les résidus de bromadiolone contenus dans des fèces de renard collectées en nature après un traitement ?
4. Si oui, est-il envisageable en nature, d'établir une relation entre l'exposition réelle d'une population de renard et cette mesure indirecte de l'exposition ?

## 4. Organisation du mémoire

La structure retenue dans ce manuscrit de thèse est la suivante. L'introduction générale constituant un état des connaissances actuelles relatives à la problématique du transfert des pesticides, et plus particulièrement de la bromadiolone, dans la chaîne alimentaire, a permis de déterminer trois axes d'approche.

Pour chacun de ces axes, les travaux réalisés seront présentés indépendamment les uns des autres. Le détail des matériels et méthodes employés ainsi que les résultats des expérimentations seront développés dans chacun de ces chapitres et seront présentés dans un format de type publication, constituant le corps du manuscrit.

Le dernier chapitre sera consacré à la discussion générale. Il reprendra les acquis fondamentaux obtenus au cours de ces travaux et présentera différentes perspectives. Dans cette partie, l'accent sera mis sur l'apport des différentes approches mises en oeuvre pour l'analyse et la compréhension des modalités de transfert de la bromadiolone et du risque qui en résulte pour les écosystèmes.



## **II. Axe 1: Persistance de la bromadiolone dans les appâts *in situ***





## **A. How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*?**

Cette expérimentation a fait l'objet d'un article publié en 2007 dans la revue *Environmental Pollution* (148, 372-379). Les auteurs sont :

Mickaël Sage <sup>a\*</sup>, Michaël Cœurduassier <sup>a</sup>, Régis Defaut <sup>b</sup>, Éric Lucot <sup>a</sup>, Brigitte Barbier <sup>c</sup>, Dominique Rieffel <sup>a</sup>, Philippe Berny <sup>c</sup>, Patrick Giraudoux <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biologie Environnementale, EA3184 USC INRA - 25030 Besançon Cedex, France.

<sup>b</sup> Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles, Immeuble Orion, 191 rue de Belfort, 25043 Besançon Cedex, France.

<sup>c</sup> UMR INRA 1233 Mycotoxines et Toxicologie comparée des xénobiotiques - Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, BP83, 69280 Marcy l'Étoile, France.

*After field treatment, both soil characteristics and climate conditions influence weakly the persistence of bromadiolone while it is dramatically increased by vole storage of baits.*

**Keywords:** Second Generation Anticoagulant Rodenticide (SGAR); Pest control; Environmental contamination; Vertebrate pesticide

---

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)381 665 714; fax: +33 (0)381 665 797

*E-mail address:* [mickael.sage@univ-fcomte.fr](mailto:mickael.sage@univ-fcomte.fr) (M. Sage).



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Environmental Pollution 148 (2007) 372–379

---

ENVIRONMENTAL  
POLLUTION

---

[www.elsevier.com/locate/envpol](http://www.elsevier.com/locate/envpol)

## How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*?

Mickaël Sage<sup>a,\*</sup>, Michaël Cœurduassier<sup>a</sup>, Régis Defaut<sup>b</sup>, Éric Lucot<sup>a</sup>, Brigitte Barbier<sup>c</sup>, Dominique Rieffel<sup>a</sup>, Philippe Berny<sup>c</sup>, Patrick Giraudoux<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biologie Environnementale, Université de Franche-Comté, EA3184 USC, INRA, 25030 Besançon Cedex, France

<sup>b</sup> Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles, Immeuble Orion, 191 rue de Belfort, 25043 Besançon Cedex, France

<sup>c</sup> UMR INRA 1233, Mycotoxines et Toxicologie comparée des Xénobiotiques, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, BP83, 69280 Marcy l'Étoile, France

Received 4 April 2006; received in revised form 4 September 2006; accepted 9 September 2006

*After field treatment, both soil characteristics and climate conditions influence weakly the persistence of bromadiolone while it is dramatically increased by vole storage of baits.*

---

### 1. Summary

We aimed to evaluate whether environmental factors affect the persistence of bromadiolone in baits in field treatment. Baits were distributed in three soils according to two types of distribution: (1) artificial galleries conform to agricultural practices; (2) storage cavities to mimic bait storage by voles. Persistence was evaluated for 30 days in galleries and 80 days in storage cavities in autumn and spring. The decrease of bromadiolone concentrations was described by a first-order kinetic model. In galleries, the half-lives ranged from 3.0 to 5.1 days in autumn and from 5.4 to 6.2 days in spring. The half-lives were similar between soils and seasons but the pattern of persistence differed lightly for two soils between seasons. Half-lives in storage cavities, 42.7 and 24.6 days in autumn and spring respectively, were longer than in galleries. To conclude, both soil characteristics and climatic conditions weakly influence persistence, while bait storage lengthens it dramatically.

## 2. Introduction

In some countries, particularly in Europe, bromadiolone, a Second Generation Anticoagulant Rodenticide (SGAR), is used for field rodent control. In France for instance, bromadiolone is the only rodenticide authorized for controlling outbreaks of the fossorial water vole *Arvicola terrestris sherman* (Giraudoux et al., 1997; Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2002). Some 400 tonnes of bromadiolone baits (i.e. bromadiolone-coated wheat grains at 0.05 g active ingredient kg<sup>-1</sup>) are used by farmers annually in the country (LIPHATECH, personal communication). Moreover, laboratory experiments on the stoat, *Mustela erminea*, and common buzzard, *Buteo buteo*, fed with voles intoxicated with bromadiolone concluded that 'secondary poisoning was possible, although very unlikely in field conditions' (Grolleau, 1983). However, evidence of negative impacts of SGARs on non-target fauna (buzzards, owls, polecats (*Mustela putorius*), stoats, etc.) has been reported worldwide (Shore et al., 1996; Eason et al., 2002; Shore et al., 2003). With regard to bromadiolone, hundreds of primary and secondary poisonings of birds and mammals were reported following vole control operations (SAGIR, 1990–2004; Berny et al., 1997). National and international authorities stressed the need for environmental risk assessment of the use of those rodenticides in the field, in particular their transfer in food webs (EPA, 1998). According to the U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 2002), this issue must consider the residue burdens available in rodent tissues which are related to the concentration of active ingredient (a.i.) in baits and to the time of exposure (Merson et al., 1984; Grolleau et al., 1989; EPA, 2002). The persistence of bromadiolone in baits is therefore a critical issue to understanding the mechanisms leading to secondary poisoning of wildlife.

The persistence of pesticides in soil is determined by transformation and loss processes such as physico-chemical and/or biological degradation, leaching, and/or volatilisation (European Commission, 2000). These processes are influenced by physico-chemical characteristics of the chemical and of the soil, and by agro-climatic characteristics of the site (Himel et al., 1990; Boesten and Linden, 1991; Larocque et al., 1998). Most previous studies of bromadiolone persistence were conducted under controlled conditions by introducing the molecule directly into the soil rather than associating it with baits, although this is the actual practice of farmers. In standard soils, the half-life of bromadiolone ranges from 1.8 to 53 days (Misra, 1995; AGRITOX, 2004) depending on the soil type. However, SGARs were considered stable in the environment and relatively immobile in soil because of their low

solubility in water (EPA, 1998). Extrapolation of half-life data to field treatments should be done with caution because of the artificial conditions under which the data were generated.

In France, wheat baits are buried mechanically in artificial galleries. Water voles store several hundred grams of food (e.g., roots, leaves) in cavities in their burrows that shaped to protect the contents from humidity (Löschnig and Schechner, 1911; Airoidi, 1976; Airoidi et al., 1976 and personal observations). Baits buried in artificial galleries may also be stored and the putative significance of their storage for bromadiolone persistence has been pointed out by Grolleau (1983).

The aims of this study are to estimate and to model bromadiolone persistence and its variability in field conditions. We hypothesize that the persistence of bromadiolone depends on (1) the physico-chemical characteristics and topographic context of the three different soils in which baits were distributed; (2) climatic conditions, i.e. season of treatment and (3) bait storage in vole cavities.

### 3. Materials and methods

#### 3.1 Study site

The study site was the *Zone Expérimentale de Lutte Anti Campagnols* (ZELAC) located on the Jura plateau in eastern France. In this area, water vole population outbreaks occur in six-year cycles and bromadiolone baits have been used for rodent control since the early 1980s. Three plots with agricultural soils exhibiting different physico-chemical characteristics and topographic contexts (Table 4) were selected according to the world reference base for soil resources of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (ISSS-ISRIC-FAO, 1998). The soils (and their geographical locations) were an Eutric cambisol (EC) (46°57'40.0, 6°47'14.4"), a Gleyic cambisol (GC) (46°57'25.6", 6°17'41.5") and a Luvisol (L) (46°57'07.7", 6°17'54.0"). The studied soils were at 895, 885 and 875 m of altitude respectively. They are typical soils of the plateaux of the Jura massif, EC being the most frequent (Bruckert and Gaiffe, 1985).

## II. Axe 1 : Persistence de la bromadiolone dans les appâts *in situ*

Soils	Eutric-cambisol (EC)	Gleyic-cambisol (GC)	Luvisol (L)
Topography	Slope top	Slope middle	Depression
Chemical characteristics			
pH H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	6.10 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.30 <sup>a</sup>	5.23 ± 0.20 <sup>b</sup>
pH KCl <sup>1</sup>	5.25 ± 0.30 <sup>a</sup>	5.10 ± 0.30 <sup>a</sup>	4.30 ± 0.20 <sup>b</sup>
Organic matter content <sup>2</sup> (%)	8.82 ± 1.49	7.62 ± 0.60	8.45 ± 0.18
Physical characteristics			
Texture <sup>3</sup>	silty clay	silty clay loam	silty clay loam
% Clay (< 2 µm) <sup>3</sup>	40.1 ± 2.3	34.2 ± 4.9	33.7 ± 0.7
% Fine silt (2-20 µm) <sup>3</sup>	41.1 ± 2.4	42.3 ± 1.3	46.9 ± 2.9
% Coarse silt 20-50 µm) <sup>3</sup>	15.8 ± 1.3	19.1 ± 4.2	16.2 ± 1.2
% Fine sand (50-200 µm) <sup>3</sup>	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.2
% Coarse sand 200-2000 µm) <sup>3</sup>	2.5 ± 0.2	3.7 ± 0.3	2.5 ± 2.2
Bulk density	1.12 ± 0.03	1.21 ± 0.05	1.17 ± 0.05
Infiltration capacity (mm.min <sup>-1</sup> ) <sup>4</sup>	2.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1	4.5 ± 0.6
2 states in the same soil for EC an L	12.3 ± 1.1		12.5 ± 0.7
Total depth (cm)	25-30	40-50	>100

Table 4. Topographic characteristics and physicochemical properties of the three soils

<sup>a</sup> Indicates the absence of difference between soils; <sup>b</sup> indicates a difference between soils

<sup>1</sup> ISO 10390 in AFNOR X31-107 (1994), <sup>2</sup> Baize (1998), <sup>3</sup> AFNOR X31-107 (1994), <sup>4</sup> Bouwer (1986)

### 3.2 Bait distribution and sampling

Wheat baits were prepared by the process used by farmers on 25 September 2003 and 16 April 2004 for the autumn and spring experiments, respectively: dried wheat grains were mechanically mixed with a commercial formulation of bromadiolone Super Caid<sup>®</sup> A659 (5 g a.i.L<sup>-1</sup>, ref. R227002, LIPHATECH, France) to achieve a nominal concentration of 50 mg a.i. per kg of bait. They were stored at ambient temperature and protected from light and humidity until treatment. Field treatment (see below) was carried out on 11 November 2003 and 21 April 2004.

### **3.2.1 Gallery treatment method**

Five 30 m long artificial galleries were dug at 15 cm depth in each plot using a special plough designed to deliver homogeneously 1 kg of wheat baits every 50 m. In each plots, the galleries were 2 m apart. In both the autumn and spring experiments, bait samples were collected daily for the 10 days following treatment (D1 → D10). Thereafter they were collected at 3–5 days intervals (D11, D14, D18, D21, D25, D30 in autumn and D13, D16, D19, D23, D29 in spring). At each sampling time, two 20 g samples of remaining baits were collected from randomly selected gallery segments. Baits were handly separated from the soil and immediately stored at –20 °C in the dark (Morin, 1988; Wright, 2002).

### **3.2.2 Storage cavity treatment method**

This type of distribution was used in the EC soil. Twenty artificial storage cavities (approximate volume 15 × 15 × 15 cm) were buried at a depth of 20 cm, each storage cavity containing 500 g of baits. Storage cavities were designed to simulate natural cavities, i.e. similar volume and to protect their content from humidity by compressing the ceiling of the cavity and leaving an access on the floor as described by Airoidi (1976). At each sampling time, two cavities were randomly selected and collected at D3, D7, D11, D18, D29, D50 and D75 for the autumn and at D5, D10, D16, D23, D29, D45, D69 and D77 for the spring. Samples were stored as for the gallery treatment method.

## **3.3 Climatic and soil conditions**

Minimum and maximum atmospheric temperatures and rainfall were recorded daily throughout the experiment (Oregon scientific WM-918 weather station). Maximum and minimum temperatures were measured with an electronic thermometer (Hobo H8 Bio-Times) in the artificial galleries in all three soils in autumn and in EC in spring.

## **3.4 Bromadiolone analysis**

Bromadiolone concentrations in wheat baits were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using methods derived from those of Hunter (Hunter, 1983a; Hunter, 1983b). All chemicals used for analysis were rigorously pure grade for HPLC. A standard (Bromadiolone, lot Bromo27 Analyse 37261M) and internal standard (Difenacoum, lot 0395167) were obtained from LIPHATECH (France) and were of a high degree of purity (>99%).

### **3.4.1 Extraction**

Two grams of baits, selected randomly from the samples, were introduced into a 100 ml Pyrex flask containing difenacoum as an internal standard (0.5 ml of a 100 µg ml<sup>-1</sup> solution). Twenty ml of methanol (Carlo Erba, HPLC grade code no. 412532, Milan, Italy) were added. Then, the sample was shaken for 20 minutes with a magnetic agitator and filtered (Filter Whatmann 2V, Diameter: 125 mm, Cat no. 1202125). Each sample was extracted twice; extracts were mixed and then evaporated to dryness under vacuum at 60 °C with a rotary evaporator.

### **3.4.2 Determination of bromadiolone concentration**

Concentrations of bromadiolone and difenacoum were quantified by HPLC coupled with a fluorimetric detector at an excitation wavelength of 315 nm and an emission wavelength of 390 nm. The elution solution was prepared with 70% methanol (Carlo Erba, HPLC grade code no. 412532, Milan, Italy) and 30% of 25 mM phosphate buffer. The phosphate buffer solution was prepared from disodium hydrogen phosphate dihydrate (Merck très pur, ref 1.06576.1000, Nogent-sur-Marne, France) and potassium dihydrogen phosphate (Prolabo RP Normapure code 26926.298, Fontenay sous Bois, France). The pH of the elution solution was adjusted with orthophosphoric acid (85%, Carlo Erba for analysis code 406002, Milan, Italy) to 6.5. The dried residue obtained from the extraction stage was reconstituted in 20 ml of the elution solution. The HPLC system was constituted of an isocratic 655A-12 pump at 1 ml min<sup>-1</sup>, an automatic AS2000A sampler (Merck, Nogent-sur-Marne, France) with a 100 µl injection loop, an RF-530 fluorimetric detector (Touzart Matignon / Shimadzu, Les Ulis, France) and a D2500 integrator (Merck, Nogent-sur-Marne, France). For each sample, 50 µl were injected in a LichroCART Nucleodur 100-5 µm C18 EC 250 × 4 mm column (Macherey-Nagel, Cat. No. 76140046, Strasbourg, France) at controlled temperature in an HPLC oven (CROCO-CIL Interchim 040-220P; temperature: 30 °C). Bromadiolone concentration was expressed in mg kg<sup>-1</sup> of fresh mass of grain because the quantity of food ingested by voles depends on its moisture content (Grolleau, 1989). Measurement validity was checked by injecting extracts of wheat baits spiked with standard bromadiolone (lot Bromo27 Analyse 37261M, LIPHATECH, France) at 50 mg kg<sup>-1</sup>. Recovery ranged from 96.2 to 102.7%.



### 3.5 Survey of physical state of baits during the experiment

In galleries and storage cavities alike, wheat grains may germinate and then decay more or less quickly depending on the season. Here, the term "grain" covers the grain and eventually the epicotyl (germ) and the hypocotyls (roots). The average number of grains by gram of fresh bait was determined and the water content of baits was evaluated in spring samples after drying at 70 °C to constant mass.

### 3.6 Statistics

Normality of data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. When normality could be accepted or when our data could be transformed to Gaussian, parametric tests were used when possible such as the t-test for independent samples and ANOVA for repeated measurements for paired samples respectively (Sokal and Rohlf, 1997). Otherwise, non parametric tests were used such as the Wilcoxon-Mann-Whitney test or Wilcoxon signed ranks test for independent or paired samples respectively (Siegel and Castellan, 1988). The decrease of bromadiolone concentration in baits was modelled from data using non linear regression. According to Soulas & Lagacherie (2001) and Ma (2001), different first-order kinetic models selected from Widianarko and Van Straalen (1996), Giraudoux et al. (2006) and Gustafson and Holden (1990) were tested. Models were compared using the information theoretic approach as outlined by Burnham and Anderson (2002) and presented according to Anderson et al. (2001). The distributed loss model (Gustafson and Holden, 1990) was selected using the Akaike Information Criterion Corrected (Sakamoto et al., 1996). This model appears as:

$$C(t) = \frac{C_0}{(1 + \beta t)^\alpha} \quad (1)$$

where  $C_0$ , the initial bromadiolone concentration in baits (in mg kg<sup>-1</sup>) calculated by the model;  $t$ , the time in days and the parameter  $\alpha$  and  $\beta$  constants.

According to the authors, parameter  $\alpha$  is dimensionless and parameter  $\beta$  has units of the rate constant  $k$ . And  $DT_{50}$ , the 50% dissipation time, is:

$$DT_{50} = \frac{0.5^{-(1/\alpha)} - 1}{\beta} \quad (2)$$

Significant differences between model parameters were checked by comparison of 95% confidence interval calculated from bootstrap bias-correct adjusted (BCa) limits (1000 permutations) (Wehrens et al., 2000). Analyses were performed using R 2.1.1 (R Development Core Team, 2004).

## 4. Results

### 4.1 Climatic and soil conditions

Minimum and maximum atmospheric temperatures decreased during the autumn experiment while they increased during the spring one. Autumn temperatures ranged from  $-13.4\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $15.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  and spring ones from  $-0.7\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $30.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The daily difference between minimum and maximum temperatures was higher in spring ( $11.4 \pm 3.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) than in autumn ( $7.2 \pm 3.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (t-test,  $p < 0.0001$ ). Total rainfall in spring was similar to autumn and snow precipitations were higher in autumn than in spring (Table 5).

In EC, GC and L soils, respectively, average temperatures were  $4.6 \pm 1.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $3.5 \pm 1.8\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $3.4 \pm 1.8\text{ }^{\circ}\text{C}$  in autumn. Minimum and maximum temperatures in EC were higher than those of the other two soils (ANOVA for repeated measurements,  $p < 0.001$ , *degrees of freedom* = 2, *F-value* = 16.1 and 9.4 for minimum and maximum temperatures respectively). Comparison between seasons showed that minimum and maximum temperatures in EC decreased in autumn, while they increased in spring (Table 5). Temperatures in EC soil ranged from  $0.3$  to  $8.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  in autumn and from  $3.3$  to  $21.3\text{ }^{\circ}\text{C}$  in spring. Daily differences between minimum and maximum temperatures were lower in autumn than in spring in the EC soil (t-test,  $p < 0.0001$ ).

	Climatic conditions				Pedo-climatic conditions (EC)	
	Daily		Cumulated precipitations		Daily	
	T <sup>°</sup> C min	T <sup>°</sup> max	Rain (mm)	Snow (cm)	T <sup>°</sup> C min	T <sup>°</sup> max
Autumn	$-1.7 \pm 4.8$	$5.41 \pm 4.4$	230	82	$2.7 \pm 1.9$	$3.8 \pm 2.4$
Spring	$5.4 \pm 3.6$	$17.2 \pm 5.5$	244	15	$7.5 \pm 2.0$	$13.9 \pm 3.9$

Table 5. Climatic and pedo-climatic conditions at study site and in EC respectively for the two seasons. Data on atmospheric and soil temperature are presented as mean  $\pm$  standard deviation

#### 4.2 Physical state of baits during the experiment

Initially, baits used in autumn contained more wheat grains per gram than those used for the spring treatment ( $27.3 \pm 1.37$  and  $24.3 \pm 1.13$  respectively) (t-test,  $p = 0.008$ ) (Figure 14). Then, in the artificial galleries, the number of wheat grains per gram decreased dramatically in autumn and spring from the end of the first day and during the 20 first days. No difference was recorded for the number of wheat grains by gram in the galleries of the three soils for the same season (Wilcoxon test,  $p > 0.2$ ). In storage cavities, the number of wheat grains by gram of baits was similar for autumn and spring for the first 20 days (Wilcoxon test,  $p = 0.38$ ) but it was greater in spring than in autumn for the 60 last days of experiment (Wilcoxon test,  $p = 0.04$ ).

Concerning baits distributed in the artificial galleries of all three soils, the percentage of dry matter was initially 90% of the fresh mass (Figure 15). Then, after burying baits, it decreased for 20 days and tended to stabilize at 10% for the 10 last days of the experiment (Figure 15). In storage cavities, the percentage of dry matter decreased slowly for 25 days and then tended to stabilize for the last days (Figure 15).

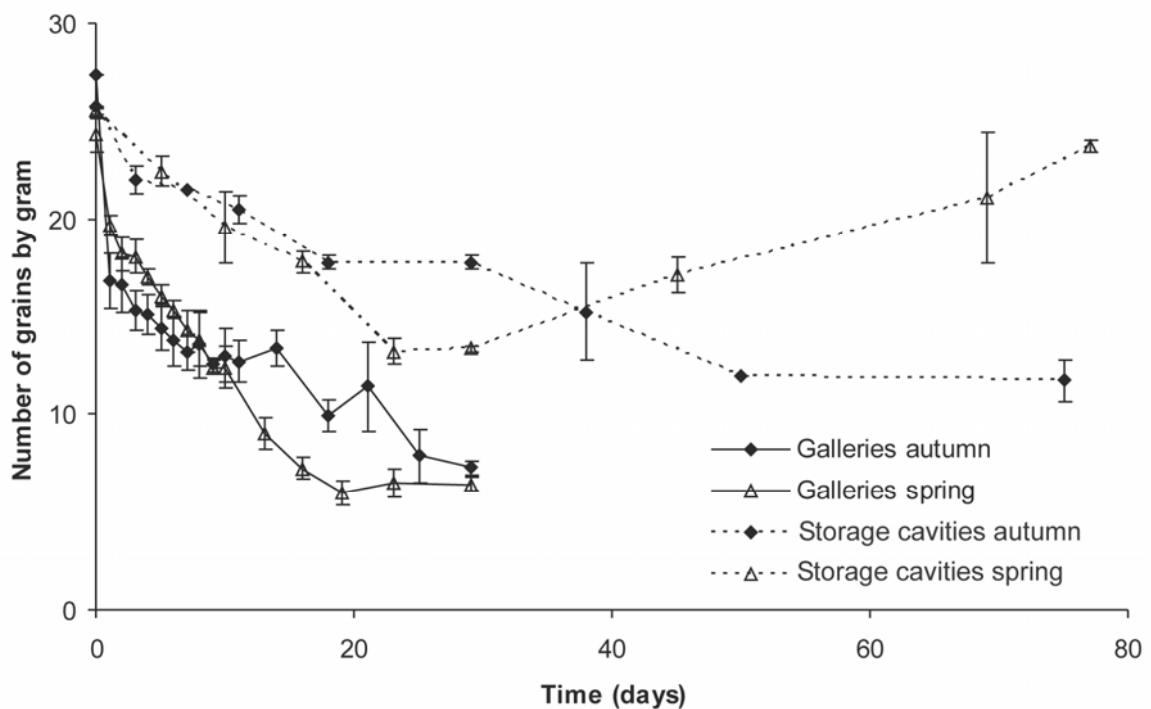


Figure 14. Number of wheat grains by gram of baits (mean  $\pm$  S.D.) in artificial galleries (n=6) and storage cavities (n=2) as a function of time for the two seasons. Data of galleries were pooled for the 3 soils.

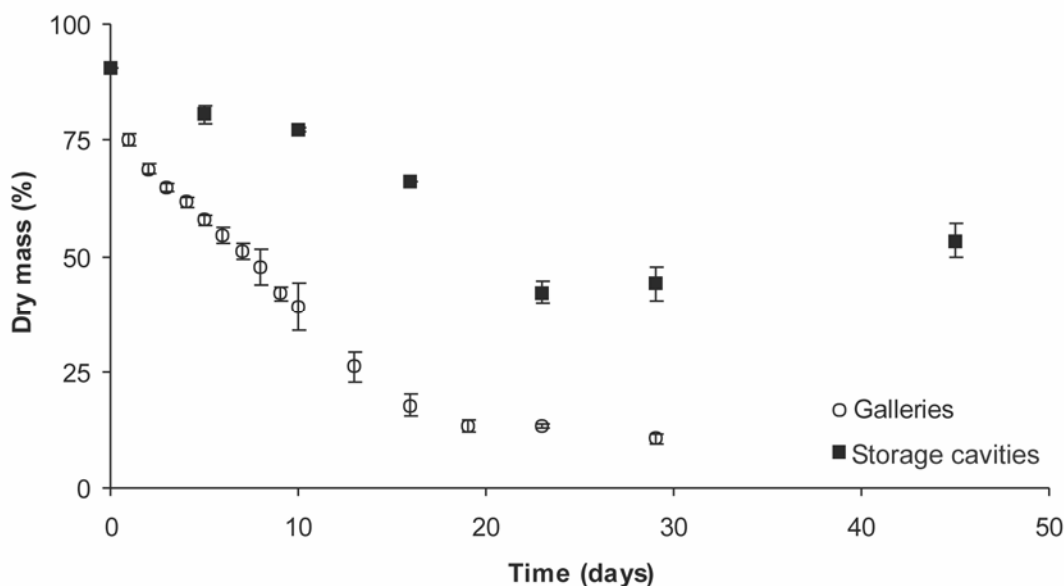


Figure 15. Percentage of dry mass in baits versus fresh mass (mean  $\pm$  S.D.) in artificial galleries (n=6) and storage cavities (n=2) in spring as a function of time. Data of galleries were pooled for the 3 soils.

### 4.3 Persistence of bromadiolone in baits

Among the three tested models, the distributed loss model (1) (Gustafson and Holden, 1990) is the one that best fits our data on bromadiolone concentration in baits over time. In spring and autumn, bromadiolone concentration in baits in artificial galleries exhibited similar patterns: a dramatic decrease during the first days after treatment and thereafter a more gradual decrease over time (Figure 16).

Whatever the season, the  $DT_{50}$  values of bromadiolone in artificial galleries were similar between soils (Table 6). In spring, bromadiolone persistence was different in the EC and L soils compared to autumn (Table 6) but no differences were recorded between  $DT_{50}$  values. In storage cavities, the  $DT_{50}$  was 10 times longer in autumn and five times longer in spring than in artificial galleries. (Table 6).

### 4.4 Contribution of different processes to bromadiolone disappearance in baits

For a given mass of fresh bait, the number of grains declines with time. Thus the decline in bromadiolone concentration in grains integrates both the molecule disappearance through degradation and/or leaching and its dilution by the increase in grain mass due to germination (Figure 15, Figure 17). The proportional effect of the dilution process can be

## II. Axe 1 : persistance de la bromadiolone dans les appâts *in situ*

determined by evaluating the quantity of bromadiolone contained not in a mass of bait but in a grain of wheat as a function of time. Indeed, at the scale of a grain, dilution did not occur even if its mass increased. From the change in the quantity of bromadiolone in a bait, it is therefore possible to determine the quantity of bromadiolone removed from baits due to ‘true disappearance’ processes and so determine the proportional effect of dilution in the decrease in bromadiolone concentrations. Considering that bromadiolone persistence (Figure 16) and the evolution of grain numbers per gram of baits (Figure 14) were similar between soils at a given season in the artificial galleries, the contribution of processes was determined from the means of bromadiolone concentrations and of the grain number per gram of bait in all three soils in the same season (Figure 17).

parameters	Autumn			Spring				
	Galleries			Storages	Galleries			Storages
	EC	GC	L	EC	EC	GC	L	EC
C0	29.15	29.83	30.59	30.04	30.50	30.14	30.42	31.74
$\beta$	0.30	0.82 a	0.36 a	0.03	0.10	0.09	0.08	0.34
$\alpha$	0.75	0.56	0.70	0.84*	1.59	1.74	1.71	0.31
R <sup>2</sup>	0.95	0.95	0.93	0.95	0.97	0.94	0.96	0.81
DT <sub>50</sub>	5.1	3.0	4.7	42.7 *	5.5	5.4	6.2	24.6

Table 6. Parameter values C0,  $\beta$  and  $\alpha$  determined in artificial galleries and storage cavities; R<sup>2</sup> and half-lives (DT<sub>50</sub> in days) in autumn and in spring from the distributed loss model (Gustafson and Holden 1990)

(<sup>a</sup> Indicates a significant difference for a parameter in a given soil between seasons ; \* Indicates a significant difference for a parameter in storage cavities between seasons: *bootstrap, BCa limit comparison, p<0.05*)

In artificial galleries, the contributions of ‘true disappearance’ processes and dilution to the decline in bromadiolone concentrations in baits were similar in autumn and spring (Wilcoxon signed ranks test,  $p = 0.33$ ;  $p = 0.15$  respectively, Figure 17). The decline in concentration during the first days of the experiment (Figure 16) was explained by bromadiolone dilution in the wheat because ‘true disappearance’ processes contributed less than 33% of the total decrease in concentration. From day 10, 50 to 60% of the concentration decrease was due to ‘true disappearance’ processes (Figure 17).

In storage cavities, the totality of the concentration decrease in baits was explained by bromadiolone dilution during the first 18 and 23 days of the experiment in autumn and spring, respectively. Then, in autumn, the concentration decrease was weakly due to 'true disappearance' processes while their contribution ranged from 27.9 to 56.1% from day 29 of the experiment in spring (Figure 17).

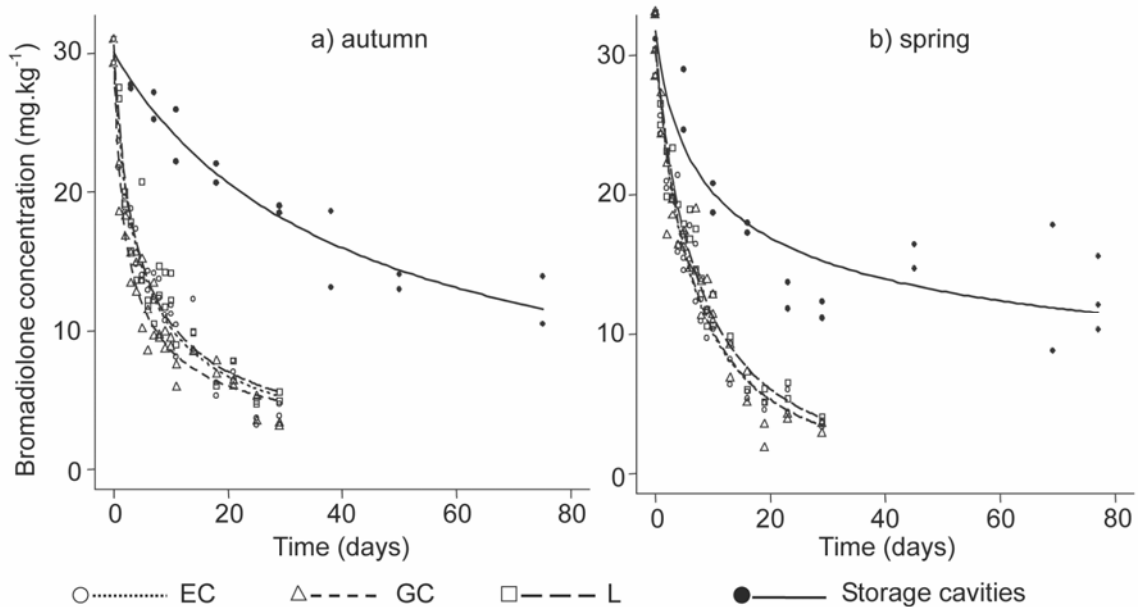


Figure 16. Bromadiolone concentration decrease in baits in autumn ( a ) and in spring ( b ) (artificial galleries: Eutric cambisol; Gleyic cambisol; Luvisol - Storage cavities in Eutric cambisol). Bromadiolone concentrations are expressed in mg kg<sup>-1</sup> fresh mass.

## 5. Discussion

This study provides original data on bromadiolone persistence after vole control operation in field. Other studies under controlled conditions showed that bromadiolone DT<sub>50</sub> in soils exhibited great variability with values ranging from 1.8 to 53 days. Moreover, they were determined in soils whose types were not always specified or in North American soils that are different than European ones (Völk and Galicia, 1992; IPCS INCHEM, 1995; Misra, 1995; AGRITOX, 2004). Accordingly, earlier data on bromadiolone persistence was not transposable to field treatment using wheat baits. In the present study, bromadiolone DT<sub>50</sub> in artificial galleries ranged from 3.0 to 6.2 days which is in agreement with the lower ranges of DT<sub>50</sub> assessed in soils in controlled conditions. Our results show a low persistence of high bromadiolone concentrations in baits in galleries and a relative homogeneity of bromadiolone persistence whatever the soil types and the season. Soil type, mainly considered in

## II. Axe 1 : persistance de la bromadiolone dans les appâts *in situ*

laboratory assays, is in our study a factor that only slightly modified bromadiolone persistence in baits in the field. According to the season,  $DT_{50}$  values determined in storage cavities were 5 to 10 times higher than in artificial galleries, and were in the upper range of  $DT_{50}$  values assessed in controlled conditions. This provides evidence that bromadiolone persistence in field treatment is first strongly influenced by the storage behaviour of voles and secondly by the season in the case of storage cavities.

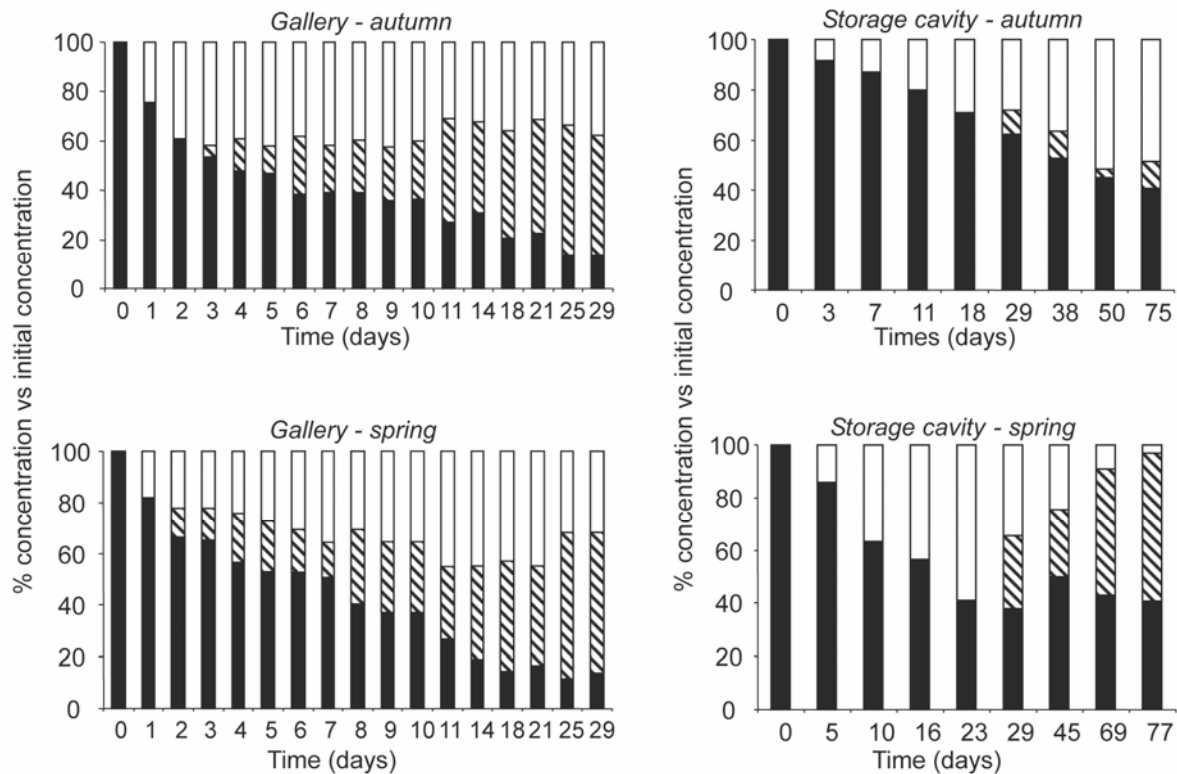


Figure 17. Remaining bromadiolone (black) (%) and contribution of the dilution processes (blank) and 'true disappearance' processes (hatched) in the decrease of bromadiolone concentrations in wheat baits in time relative to the initial concentration in baits.

The decrease of bromadiolone concentration in baits exhibited a two-phase pattern in accordance with the first order kinetic models generally reported to describe pesticide persistence in soils (Gustafson and Holden, 1990; European Commission, 2000; Ma et al., 2001; Soulas and Lagacherie, 2001). In the present case, one can hypothesize that a quantity of bromadiolone was at the surface of the wheat grain and then was lost to leaching and to biological/chemical degradation. This may help to explain the initial sudden decrease in bromadiolone concentration. The proportion absorbed in the bait would be more stable several days into the experiment.

### **5.1 Processes and factors influencing persistence of bromadiolone in wheat baits**

The persistence of pesticides in soils is affected by numerous biological, chemical and physical processes such as transformation, degradation and mineralization but also by leaching, volatilization and uptake by organisms (Jones et al., 1996; European Commission, 2000). These processes depend mainly on both substance and soil characteristics, microbial biomass, climate and agricultural practices (Walker and Barnes, 1981; Parker and Doxtader, 1983; Veeh et al., 1996; Reid et al., 2000; Sijm et al., 2000; Soulas and Lagacherie, 2001). From the present results, three mechanisms may explain the decline of bromadiolone concentration in baits during the experiment: (1) the degradation of the molecule in metabolites by physico-chemical and/or biological processes; (2) the leaching of the molecule from the wheat grains to the soil notably with rainfall; (3), the dilution of the active substance in baits due to the mass increase of the wheat during the experiment. Both degradation and leaching correspond to the processes of 'true disappearance' evoked in the results section. Concerning degradation, bromadiolone metabolites are little known and, to date, only the bromadiolone-ketone and two unknown metabolites have been identified (Misra, unpublished in EPA, 1998). Moreover, very little is known about the mobility and toxicity of these metabolites (EPA, 1998). Rodenticide anticoagulants are not very soluble in water (EPA, 1998, IPCS INCHEM, 1995), suggesting that leaching accounts for little of bromadiolone disappearance from baits. The dilution process due to both water absorption and bait germination strongly contributed to the decrease of bromadiolone concentration in artificial galleries. Dilution explains almost the entire decline in concentration during the first two days of the experiment. Thereafter its contribution decreased to 45% after 29 days, showing the importance of degradation and/or leaching for bromadiolone persistence. In storage cavities, dilution was the main cause of the decline in bromadiolone concentration in baits. No leaching or degradation were observed over the 20 days following burial of baits. Although there were similar residual bromadiolone percentages in autumn and in spring at the end of the experiment, the contribution of the different processes of disappearance (degradation and/or leaching and dilution) varies with the season. These results suggest that climatic conditions may determine the processes involved in the decline in concentrations in baits.

For anticoagulants in soils, only experiments conducted under controlled conditions have demonstrated that organic matter and/or clay content affects bromadiolone persistence (Spare and Olson, 1980). In aqueous solution, the presence of  $H_3O^+$  ions and increases in temperature and salinity can all enhance degradation (Morin, 1988). In the present study, the data indicate that: first, in a given season, neither edaphic nor topographic characteristics



influenced bromadiolone persistence in baits. Second, in artificial galleries, the patterns of bromadiolone concentration over time are lightly different among seasons in GC and L soils, demonstrating the low influence of climatic conditions on the fate of bromadiolone. Warm temperatures are generally reported to increase the dissipation of pesticides (Soulas and Lagacherie, 2001) but bromadiolone persists longer in spring when temperatures are higher. Moreover, the germination of baits, depending on climatic conditions, occurred mainly in spring. This amplifies the dilution of the molecule in both galleries and storage cavities due to bait mass increase and thus decreases bromadiolone persistence in spring. While climatic and edaphic factors have a minor influence on bromadiolone persistence in galleries, climatic conditions lightly influence its pattern of persistence in storage cavities. Finally, bromadiolone persistence in baits is dramatically influenced by bait storage. This can be partially explained by the slower germination of the wheat in the storage cavities than in galleries, limiting the 'dilution effect'. Furthermore, because of the 'waterproof' structure of the storage cavities, two non exclusive hypotheses may be advanced: (1) less contact of baits with the soil which limits microbial degradation, (2) less leaching. Further studies are needed to identify and quantify the physico-chemical and/or biological mechanisms involved in bromadiolone dissipation in baits in field conditions.

### **6. Conclusion**

The transfer of bromadiolone in food webs and the associated risk to non-target species are closely related to the fate of the molecule in various ecological compartments (EPA, 2002). Present results suggest that voles (and then predators) may be exposed to bromadiolone several weeks after field treatments. In galleries, the dissipation of the molecule leads to the presence of baits contaminated at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  for 30 days after treatment. Moreover, we show that more than environmental conditions, the storage of baits by voles should be considered when assessing the risk of poisoning by bromadiolone. We proved that bromadiolone persists at high concentrations in baits, i.e.,  $12 \text{ mg kg}^{-1}$ , for at least 80 days after treatment. Recolonisation of treated parcels by voles may occur several weeks after treatment, when individuals may eat preserved baits and so present a delayed risk for predators.

In addition to bromadiolone persistence in baits, other information is needed to understand the transfer processes and to assess the risk of secondary poisoning in the field. Thus, the fate of bromadiolone in an agrosystem is a complex phenomenon which also depends on the fate and toxicity of bromadiolone and its metabolites in the various

compartments of the food web and the factors influencing interactions between voles and their predators.

## 7. Acknowledgements

This study received supports from the *Conseils généraux* of the Doubs and the Jura departments and from the *Région* of Franche-Comté. We are grateful to B. Videmann of the ENVL, D. Truchetet of the *Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt*, and to G. Cordier and the farmers of the ZELAC area for their participation and technical support. Thanks to S. Lamarque, C. Romain and D. Pleydell for their valuable advice on lab work and bibliography and to A. de Vaufleury and R. Scheifler for advice when preparing the MS.

## 8. References

- AFNOR, 1994. Évaluation de la qualité des sols - Volume 1 : méthodes d'analyse chimique - Volume 2 : méthodes d'analyses physique et biologique. Paris, France.
- AGRITOX, 2004. Fiche d'information sur les substances actives phytopharmaceutiques - Bromadiolone / Lipha. <http://www.inra.fr/agritox>
- Airoldi, J.P., 1976. The burrow system of the fossorial form of the water vole, *Arvicola terrestris scherman Shaw (Mammalia, Rodentia)*. Sonderdruck aus Z. Säugetierkunde f. Säugetierkunde Bd. 41, 23-42.
- Airoldi, J.P., Altrocchi, R., Meylan, A., 1976. The burrowing behavior of the water vole, *Arvicola terrestris scherman Shaw (Mammalia, Rodentia)*. Revue Suisse de Zoologie 83, 282-286.
- Anderson, D.R., Link, W.A., Johnson, D.H., Burnham, K.P., 2001. Suggestions for presenting the results of data analyses. Journal of wildlife management 65 (3), 373-378.
- Baize, D., Girard, M.C., 1998. A sound reference base for soils the référentiel pédologique. INRA ed, Versailles, France.
- Berny, P.J., Buronfosse, T., Buronfosse, F., Lamarque, F., Lorgue, G., 1997. Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. Chemosphere 35 (8), 1817-1829.
- Boesten, J., Linden, A.V.d., 1991. Modeling the influence of sorption and transformation on pesticides leaching and persistence. Journal of Environmental Quality 20, 425-435.
- Bouwer, H., 1986. Intake rate: cylinder infiltrometer. In: Methods of soil analysis, part 1. Physical and mineralogical methods. Agronomy monograph n°9 (2nd ed.). Am. Soc. of Agronomy, Soil Science Society of America Journal

- Bruckert, S., Gaiffe, M., 1985. Les sols de Franche-Comté. CUER, Besançon, France.
- Burnham, K.P. & Anderson, D.R., 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach (2nd ed.). Springer-Verlag, New York.
- Eason, C.T., Murphy, E.C., Wright, G.R.G., Spurr, E.B., 2002. Assessment of risks of brodifacum to non-target birds and mammals in New Zeland. *Ecotoxicology* 11, 35-48.
- EPA, 1998. Registration Eligibility Decision (RED) Rodenticide Cluster. EPA 738-R-98-007. Environmental Protection Agency, United States.  
<http://www.epa.gov/pesticides/registration/status.htm>
- EPA, 2002. Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mammals: a Comparative Approach. Environmental Protection Agency, United States.  
<http://www.epa.gov/pesticides/registration/status.htm>
- European Commission, 2000. Guidance Document on Persistence in Soil; Working Document. Directorate General for Agriculture.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Habert, M., Quere, J.P., Deblay, S., Defaut, R., Duhamel, R., Moissenet, M.F., Salvi, D., Truchetet, D., 1997. Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris scherman*): a land usage and landscape perspective. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 66 (1), 47-60.
- Giraudoux, P., Tremollières, C., Barbier, B., Defaut, R., Rieffel, D., Bernard, N., Lucot, E., Berny, P., in press. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environmental Research*
- Grolleau, G., 1983. Le rodenticide anticoagulant bromadiolone est-il dangereux pour les animaux prédateurs et en particulier les rapaces? *La Défense des Végétaux* 219, 14-22.
- Grolleau, G., Lorgue, G., Nahas, K., 1989. Toxicité secondaire, en laboratoire, d'un rodenticide anticoagulant (bromadiolone) pour des prédateurs de rongeurs champêtres: Buse variable (*Buteo buteo*) et Hermine (*Mustela erminea*). *Bulletin OEPP/EPPO* 19, 633-648.
- Gustafson, D.I., Holden, L.R., 1990. Nonlinear pesticide dissipation in soil: A new model based on spatial variability. *Environmental Science & Technology* 24 (7), 1032-1038.
- Himel, C.M., Loats, H., Bailey, G.W., 1990. Pesticide sources to the soil and principles of spray physics. In: *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling*. 2, Soil Sci. Soc. Am. Book Series
- Hunter, K., 1983a. Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. I. Fluorescence detection using post-column techniques. *Journal of Chromatography* 270, 267-276.
- Hunter, K., 1983b. Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. II. Fluorescence detection using ion-pair chromatography. *Journal of Chromatography* 270, 277-283.

- IPCS INCHEM, 1995. International programme on chemical safety, anticoagulant rodenticides. Environmental Health Criteria 175, Geneva. [www.inchem.org](http://www.inchem.org)
- ISSS-ISRIC-FAO, 1998. World reference base for soil resources. World Soil Resources Reports N° 84. FAO UN. Rome, Italy.
- Jones, K.C., Alcock, R.E., Johnson, D.L., Nothcott, G.L., Semple, K.T., Woolgar, P.J., 1996. Organic chemicals in contaminated land: analysis significance and research priorities. Land Contamination and Reclamation 3, 189-197.
- Larocque, M., Banton, O., Lafrange, P., 1998. Simulation par le modèle AgriFlux du devenir de l'atrazine et du dééthylatrazine dans un sol du Québec sous maïs sucré. Rev. Sci. Eau. 11, 191-208.
- Löschnig, J., Schechner, K., 1911. Die Wühlmaus : ihre Lebensweise und Bekämpfung. Herausgeg. v. Landesobstbauverein Niederösterreich, Wien.
- Ma, G.L., Gan, J., Papiernik, S.K., Becker, J.O., Yates, S.R., 2001. Degradation of soil fumigants as affected by initial concentration and temperature. Journal of Environmental Quality 30, 1278-1286.
- Merson, M.H., Byers, R.E., Kaukeinen, D.E., 1984. Residues of the rodenticide brodifacoum in voles and raptors after orchard treatment. Journal of Wildlife Management 48 (1), 212-216.
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2002. Arrêté ministériel du 17 décembre 2001 relatif aux conditions d'emploi de la bromadiolone pour la lutte contre le Campagnol terrestre. n° 25 du 30 janvier 2002, p. 2015.
- Misra, B., 1995. Aerobic soil metabolism of bromadiolone: amended final report: Lab Project Number: ME 9200154. Unpublished study prepared by Pittsburgh Environmental Research Lab, Inc.
- Morin, M.F., 1988. Etude de l'impact sur le milieu naturel de la bromadiolone, rodenticide anticoagulant : Evolution en milieu aqueux et bioaccumulation sur des organismes terrestres et aquatiques. Thèse de doctorat, Université de Poitier. 129pp.
- Parker, L.W., Doxtader, K.G., 1983. Kinetics of microbial degradation of 2,4-D in soil: effects of temperature and moisture. Journal of Environmental Quality 12, 553-558.
- R Development Core Team, 2004. R: A language and environment for statistical computing. ISBN 3-900051-00-3. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T., 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. Environmental Pollution 108 (1), 103-112.
- SAGIR, 1990-2004. Traitement de campagnols aux anticoagulants. Evaluation de la mortalité de la faune non cible dans le Doubs. Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage. Doubs, France.

- Sakamoto, Y., Ishiguro, M., Kitagawa, G., 1996. Akaike Information Criterion Statistics. D. Reidel Publishing Company.
- Shore, R.F., Birks, J.D.S., Freestone, P., Kitchener, A.C., 1996. Second-generation rodenticides and polecats (*Mustela putorius*) in Britain. *Environmental Pollution* 91 (3), 279-282.
- Shore, R.F., Birks, J.D.S., Afsar, A., Wienburg, C.L., Kitchener, A.C., 2003. Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. *Environmental Pollution* 122 (2), 183-193.
- Siegel, S., Castellan, N.J., 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. Mc Graw-Hill International, New York.
- Sijm, D., Kraaij, R., Belfroid, A., 2000. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environmental Pollution* 108, 113-119.
- Sokal, P.R., Rohlf, F.J., 1997. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Compagny, New York.
- Soulas, G., Lagacherie, B., 2001. Modelling of microbial degradation of pesticides in soils. *Biology and Fertility of Soils* 33, 551-557.
- Spare, W., Olson, S.B., 1980. 14C-Bromadiolone soil leaching. Unpublished report submitted to WHO by Lipha S.A. Biospherics Inc. Beltsville, Maryland.
- Veeh, R.H., Inskeep, W.P., Camper, A.K., 1996. Soil depth and temperature effects on microbial degradation of 2,4-D. *Journal of Environmental Quality* 25, 5-12.
- Völk, S., Galicia, H., 1992. 14C-Bromadiolone: Degradation and metabolism in soils incubated under aerobic conditions. (Unpublished report submitted to WHO by Lipha S.A., Lyon), Umweltchemie AG. Itingen, Switzerland.
- Walker, A., Barnes, A., 1981. Simulation of herbicide persistence in soil: a revised computer model. *Pesticide Science* 12, 123-132.
- Wehrens, R., Putter, H., Buydens, L.M.C., 2000. The bootstrap: a tutorial. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 54, 35-52.
- Widianarko, B., Van Straalen, N., 1996. Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (3), 402-406.
- Wright, G.R.G., 2002. Protocol for Tissue Sampling Testing for Vertebrate Pesticides in Animals. Landcare Research New Zealand. 1-8.

## 9. En Bref

La persistance de la bromadiolone dans les appâts enterrés dans les galeries de traitement est courte (demi-vie allant de 3 à 6 jours) et les caractéristiques physico-chimiques et topographiques des sols étudiés ont peu d'influence.

Par contre cette persistance peut être considérablement allongée par la mise en réserve des appâts (en fonction des conditions climatiques : demi-vie allant jusqu'à 45 jours).

La présence d'appâts contenant de fortes concentrations en bromadiolone pendant plusieurs mois après un traitement n'avait jusqu'alors jamais été rapportée.

Ce phénomène peut avoir des conséquences importantes en terme de risque écologique en provoquant des intoxications différées de rongeurs.



### **III. Axe 2: Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement**





## **A. Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of the water vole, *Arvicola terrestris***

Cette expérimentation a fait l'objet d'un article publié dans la revue *Science of the Total Environment* (407, 211-222). Les auteurs sont :

Mickaël Sage <sup>a\*</sup>, Michaël Cœurdassier <sup>a</sup>, Régis Defaut <sup>b</sup>, Frédéric Gimbert <sup>a</sup>, Philippe Berny <sup>c</sup>,  
Patrick Giraudoux <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chrono-Environment, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, University of Franche-Comte 25030 Besançon Cedex, France.

<sup>b</sup> Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles, Immeuble Orion, 191 rue de Belfort, 25043 Besançon Cedex, France.

<sup>c</sup> Toxicology laboratory, UMR INRA 1233, College of Veterinary Medicine, BP83, 69280 Marcy l'Étoile, France.

**Key-words:** Anticoagulant rodenticide, Secondary poisoning, Pest control, Vertebrate pesticide.

---

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)381 665 714; fax: +33 (0)381 665 797

*E-mail address:* [mickael.sage@univ-fcomte.fr](mailto:mickael.sage@univ-fcomte.fr) (M. Sage).

## 1. Summary

SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT 407 (2008) 211–222



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



[www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)



### Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of the water vole, *Arvicola terrestris*

Mickaël Sage<sup>a,\*</sup>, Michaël Coeurdassier<sup>a</sup>, Régis Defaut<sup>b</sup>, Frédéric Gimbert<sup>a</sup>,  
Philippe Berny<sup>c</sup>, Patrick Giraudoux<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chrono-Environment, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, University of Franche-Comte 25030 Besançon Cedex, France

<sup>b</sup> Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles, Immeuble Orion, 191 rue de Belfort, 25043 Besançon Cedex, France

<sup>c</sup> Toxicology laboratory, UMR INRA 1233, College of Veterinary Medicine, BP83, 69280 Marcy l'Étoile, France

#### ARTICLE DATA

##### Article history:

Received 26 May 2008

Received in revised form

28 August 2008

Accepted 3 September 2008

Available online 26 October 2008

##### Keywords:

Anticoagulant rodenticide

Secondary poisoning

Pest control

Vertebrate pesticide

#### ABSTRACT

We document the kinetics of bromadiolone in two rodent populations after a field control of water voles, and their implications for predator exposure. Water voles and common voles were trapped aboveground and underground from 1 to 135 days after bromadiolone treatment in the field. Livers, digestive tracts, and rests of the body were analyzed separately.

Our results indicate that 99.6% of the water voles trapped underground and 41% of the common voles trapped aboveground contain bromadiolone residues. Concentrations were maximal between 3.3 and 6.5 days after treatment, according to the tissues examined and the model applied for water voles, and after 1.3 to 3.7 days for common voles. Water voles appeared available almost exclusively for foraging predators. Common voles, found less likely to be poisoned and exhibiting weaker concentrations, were mainly sampled aboveground. The liver, primarily eaten by some predators and scavengers, contains a larger bromadiolone quantity (59% of the total amount found in water voles). The rejection of the digestive tract by those species may lead to a subsequent consumption of voles with higher bromadiolone concentrations (from +3.8 to +5.8% of concentration) and provide a moderate risk increase. After 135 days, eight of the ten water voles and one of the two common voles exhibited detectable residues. Additionally, one specimen presented higher concentrations than the others, and similar to those measured in Voles trapped between the first 15–20 days. This may have consequences on predator intoxications several months after treatment.

These results integrate individual differences for the two main rodent species present in treated areas. Implications for predator exposure were investigated at the end of the study and suggest that, if the risk of secondary poisoning is maximal during the first 15–20 days when the rodent densities remain high, exposure conditions are maintained for at least 135 days.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 2. Introduction

Anticoagulant pesticides are used worldwide to control rodent populations (Erickson and Urban, 2002). Compared to first generation or indandione derivative anticoagulants, Second Generation Anticoagulant Rodenticides (SGARs) are more acutely toxic to mammals and have a longer persistence in vertebrate tissues (WHO - World Health Organization, 1995; Erickson and Urban, 2002). These characteristics provide SGARs with a high risk for non-target mammals and birds, and the secondary poisoning of predators by anticoagulants via contaminated rodents has been widely reported (McDonald et al., 1998; Murphy et al., 1998; Alterio et al., 1999; Stone et al., 1999; Shore et al., 2003; Fournier-Chambrillon et al., 2004; Walker et al., 2008).

Among SGARs, bromadiolone is extensively used for the field control of rodents, especially in Europe. In accordance with the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (2002), bromadiolone is the only pesticide authorized to control the population outbreaks of the fossorial water vole *Arvicola terrestris Sherman* in France. Laboratory experiments on stoat, *Mustela erminea*, and common buzzard, *Buteo buteo*, fed with voles intoxicated with bromadiolone led to the conclusion that “*secondary poisoning was possible, although very unlikely in field conditions*” (Grolleau et al., 1989). Moreover, although bromadiolone risk to non-target species is considered to be moderate (birds) to high (mammals), there is a lack of both field and laboratory data to support these assumptions (USEPA, 1998; Erickson and Urban, 2002). However, predictions based on laboratory experiments carried out on captive specimens are inconsistent with secondary poisoning recorded in the field. As for other SGARs, the negative impact of bromadiolone on non-target vertebrates (e.g. common buzzard, red fox and red kite) were reported in eastern France following intensive control operations of vole populations over a large spatial scale (e.g. 60000ha in Doubs department during 1998-1999) (SAGIR, 1990-2006; Berny et al., 1997; Raoul et al., 2003; Berny, 2007; Berny and Gaillet, 2008). Therefore, national and international authorities stressed the need for environmental risk assessment of the use of those rodenticides in the field, especially on their transfer in food webs (USEPA, 1998). In addition, survey programs showed that anticoagulant residues in wildlife (e.g. (Eason et al., 1996; Shore et al., 1999; Barnett et al., 2006) have increased over the last decade, heightening worldwide concern regarding the non-target effects of rodenticide use.

Ecotoxicological risk is a function of both exposure and toxicity. According to Erickson and Urban (2002), the assessment of secondary poisoning of non-target fauna by rodenticides must consider the residue burdens available in rodent tissues, which are in part

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

related to the concentration of active ingredient (a.i.) in baits and the duration of exposure (Merson et al., 1984; Grolleau et al., 1989; Erickson and Urban, 2002). During field control operations, the persistence of bromadiolone (characterized by a 50% dissipation time  $DT_{50}$ ) range from 2.9 to 6.0 days in wheat baits buried in treatment galleries (Sage et al., 2007). However, the storage of baits by voles increases the persistence of bromadiolone up to 10 times, making bromadiolone persistent at high concentrations in baits, i.e., 12 mg/kg 80 days after treatment. This could lead to a delayed exposure of rodent predators during a possible re-colonization of treated parcels by voles (Sage et al., 2007). In laboratory conditions, it was demonstrated that SGARs are persistent compounds in rodents, with a  $DT_{50}$  ranging from 170 to 300 days for bromadiolone in rat tissues, the highest concentrations being detected in the liver (Erickson and Urban, 2002). To our knowledge, only Deley and Joseph (1985) and Giraudoux et al. (2006) have studied bromadiolone residues in rodent populations in field conditions. Deley and Joseph (1985) reported residues in water voles exposed to 140 mg of bromadiolone/kg baits and trapped for three days after treatment. Giraudoux et al. (2006) showed that bromadiolone residues in the water vole population were stable for ten days after treatment, and concluded that such a level of residues in rodents could lead to a daily ingested dose by predators higher than the known- $LD_{50}$ ' (lethal dose of 50% of the population) for different vertebrate species. However no data are available for longer periods of time. It therefore seems essential to complete these data on rodent species present in treated parcels, and to consider the bromadiolone persistence in baits, as well as the vole storage behavior.

The objectives of this study were to assess the kinetics of bromadiolone residues in rodent populations present in treated areas after a field control; in our case in the water vole, i.e. the target species, and the common vole (*Microtus arvalis*), a non-target species. These two grassland rodent species, capable of reaching large densities, are both eaten by predators. For the purposes of our study, the rodents were trapped for 135 days after treatment, and bromadiolone concentrations were determined in the liver, the digestive tract, and the rest of the body. The answers to three vital questions are discussed based on the results obtained: (1) At what time are bromadiolone residues maximal, and how long after the original treatment does bromadiolone persist in rodent populations? (2) Does the distribution of bromadiolone in tissues influence predator exposure in function of their feeding behaviour? (3) How do the density and accessibility of preys change over time? Then, implications of those results on the secondary poisoning of non-target species over time are discussed.

### 3. Materials and methods

#### 3.1 Study site

The study site was a parcel of 9.7 ha localized at Pissenavache (N 46°56'34,1"; E 006°16'48,6"; 890-910 m of altitude) on the Jura plateau in Eastern France. In this area, water vole outbreaks occur on six-year cycles and bromadiolone baits have been used for control since the early 1980s. An index line transect (parcel diagonal) was performed to estimate the water vole density according to Giraudoux et al. (1995). Vole indices (burrows, earth tumuli, etc.) were recorded in 50% of 10 m intervals along the transect, approximately corresponding to 200 individuals per ha. Wheat baits were prepared by the process used by farmers: dried wheat grains were mixed with a commercial formulation of bromadiolone Super Caid® A659 (5 g a.i./L, ref. R227002, Liphatech Merck, France) to achieve a nominal concentration of 50 mg of bromadiolone per kg of bait. Then, they were stored at ambient temperature and protected from light and humidity during two weeks until treatments.

The experimental parcel had not been previously treated with bromadiolone since at least four years. In agreement with farmer practices, the baits were distributed into artificial galleries. Sixteen artificial galleries were placed 5 m apart and were 400 m long. This corresponds to a treated zone of 80 m wide. The burrow plough was set to deliver 1 kg of bait per 100 m, at a depth of 15 cm. The quantity of baits used was 20 kg/ha, which corresponds to the higher limit authorized by the French legislation. The field treatment was performed on the 17<sup>th</sup> of November 2004. To allow for the re-colonization of the treated zone by rodents living in surrounding areas, only the central part of the parcel was treated.

#### 3.2 Rodent sampling

Rodents were sampled only on the treated part of the parcel each day during the ten days following treatment, and every three or four days after that, by spacing out trapping sessions gradually during 135 days (D1 to D10 and D13; D16; D19; D24; D27; D49; D135). No sampling was possible between D49 and D135 (40 cm of snow on the parcel).

*Underground trapping* - Depending on the trapping efficiency, an increasing number (from 6 to 50) of underground kill-traps 'Topcat' (topcat GmbH, Wintersingen, Switzerland) were placed, in burrows with fresh vole sign, in order to randomly catch at least six water voles for each sampling day. 'Topcat' traps were un-baited and were set the morning of the sampling day and controlled every half hour. The variation in the relative density of water

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

voles on the treated parcel over time was estimated by measuring the trapping efficiency expressed as the number of captures per trap per day.

*Aboveground trapping* - A 400 m long and 40 cm high wood barrier was buried at a depth of 5 cm at the center of the treated area in order to intercept rodents circulating on the ground. Six additional barriers (4 m long) were randomly placed perpendicular to artificial galleries on the treated zone. One hundred and twenty ground traps 'Deadend 2' (topcat GmbH, Wintersingen, Switzerland) were placed every six meters on both sides of the central barrier. Four ground traps were placed on both sides of each additional barrier, and fifty ground traps were placed over the entire treated parcel, preferentially on the rodent trail. 'Deadend 2' traps were placed in the parcel during the 135 days of the experiment. These were un-baited and were set each evening before the sampling day and controlled in the morning and evening of the sampling days.

*Collection of carcasses* - As intoxicated rodents could die aboveground of the treated parcel; carcasses were carefully searched on every sampling day.

Each specimen (both trapped and carcasses) was labeled individually and stored frozen (-20 °C) until the tissue processing was performed. The eyes from each specimen were taken and stored in 10% formalin for further determination of the relative age of the specimen, which was performed by weighing the dried crystalline lens (Martinet, 1966; Janova et al., 2003).

### **3.3 Tissue processing and bromadiolone titration**

The specimens were thawed at room temperature, measured, and weighed. The liver, digestive tract, and the rest of the body (referred to as the carcass below) were separated. The liver is usually considered the main storage organ for anticoagulants (USEPA, 1998), and many predators (red fox, stone marten, stoat) feed primarily on this and discard the digestive tract (Delattre, 1987; Artois, 1989). Each tissue category was weighed and prepared for bromadiolone titration. The whole liver was stored separately. The digestive tract was homogenized for 1 min using an Ultra Turrax tissue disperser (T25 Basic S.25.N - 18 G, IKA-WERK, Staufen, Germany). Carcasses were immersed in liquid nitrogen (Air liquide, Audincourt, France) for three s, and then crushed in a Blixer 3 Homogenizer (Robo-coupe, Vincenne, France) with 150 g of solid carbon dioxide (Cryo Express, Bobigny, France), according to the method of Atterby et al. (2005). The carcass was mixed for three min to obtain a homogeneous powder. Additional solid carbon dioxide was added, if

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

necessary, to keep the sample frozen. Each tissue sample was stored separately at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until extraction.

Tissues were thawed and an aliquot was weighed (0.2 g for liver samples, 1.0 g for digestive tract and carcass samples) and placed in a 100 mL tube containing difenacoum (lot 0395167, Lipha-Tech, France) as an internal standard (200  $\mu\text{L}$  of a 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution) and 10 mL of acetone (Carlo Erba analytical grade, Italia). This solution was homogenized for 1 min using an Ultra Turrax tissue disperser. The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Two mL of supernatant was taken and carefully evaporated to dryness under a stream of nitrogen at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The residue was resuspended with 200  $\mu\text{L}$  of the elution solution (Giraudoux et al., 2006), shaken for 20 s with a Vortex (MS2 Minishaker IKA-WERK, Staufen, Germany), ultrasonicated (Kunshan Ultrasonic, Jiangsu, China) for two min to facilitate dissolution, and then centrifuged at 3000 rpm for five min before injection.

Bromadiolone concentrations in tissues were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using methods derived from Hunter (Hunter, 1983<sup>a; b</sup>), according to Giraudoux et al. (2006). The method was linear at the concentrations tested ( $r^2 > 0.99$ ). The limits of detection (LOD) for bromadiolone were 0.05 mg/kg in the body, 0.1 mg/kg in the digestive tract, and 0.3 mg/kg in the liver (based on the mean noise level + 3 standard deviations) and limits of quantification (LOQ) were 0.2 mg/kg, 0.5 mg/kg, and 1 mg/kg in the same tissues (based on the mean noise level + 10 standard deviations). All the values between the LOD and LOQ were replaced by the half of these two values. Spiked liver, digestive tract, and body samples were used for quality assurance purposes (Bromadiolone, lot Bromo27 Analyse 37261M, Lipha-Tech, France). The percentage of recovery varied between 77.9% and 89.5% for bromadiolone and its internal standard difenacoum in all matrices. The repeatability was excellent ( $\text{CV} < 10\%$  over six days). The ratio of bromadiolone to internal standard was used to determine bromadiolone concentrations. From the concentrations in the three entities, we calculated the concentration in the whole body.

#### 3.4 Statistical analysis

The normality of the data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. When the normality could be accepted, or when our data could be transformed to Gaussian, ANOVA was used (Sokal and Rohlf, 1997). Otherwise, non-parametric Kruskal-Wallis or Wilcoxon tests were used (Siegel and Castellan, 1988).

The intoxication kinetics of rodent populations were modeled from the data obtained using non-linear regression. Although Newman (2001) defined the population ecotoxicology, to our knowledge, the pesticide kinetics at the population level are poorly documented in the



### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

literature. Two first-order compartment models normally used at the individual level were compared. The first (Pineiro and Bates, 2000) is derived from a compartment model in pharmacokinetics, and describes the concentration of a drug in the serum following a single oral dose. The second tested model derived from Widianarko and Van Straalen (1996), is initially illustrated by curve fitting using observations on the toxicity of an insecticide to a terrestrial isopod and corresponds to the modelling of internal body concentration kinetic at individual scale after a single contamination of the medium. These two non-linear models were fitted using generalized least squares and variance functions. Then, they were compared using the information theoretic approach as outlined by Burnham and Anderson (2004). The second model with variance modeling was selected using the Akaike Information Criterion Corrected (Sakamoto et al., 1996). This model was:

$$C(t) = \frac{a}{k_2 - k_0} (e^{-k_0 t} - e^{-k_2 t}) \quad (1)$$

where  $C(t)$  is the internal concentration at time  $t$  (mg/kg);  $a$  the assimilation rate (mg of bromadiolone /kg tissue/d);  $k_2$  the rate constant for elimination and other loss processes from the body such as metabolism ( $d^{-1}$ ); and  $k_0$  the rate constant for degradation of the chemical in baits ( $d^{-1}$ ). This last variable was estimated from the data of Sage et al. (2007) using equation 2:

$$C(t) = C(0)e^{-k_0 t} \quad (2)$$

where  $C(t)$  is the concentration at time  $t$  and  $C(0)$  is the initial concentration of bromadiolone in the baits. Since we did not know if rodents fed on baits in galleries (where the persistence of the molecule is smaller) and/or in storage cavities (where the DT50 is ten times higher than in artificial galleries), both possibilities were investigated ( $k_0_{galleries} = 0.106$ ,  $k_0_{storages} = 0.057$ ).

The accumulation and elimination parameters (eq. 1) were estimated for the three tissues, the whole body, and the whole body without the digestive tract of each species by fitting the model with an exponential variance function. The variance model retained is a constant plus a power of the absolute value of the variance covariate. The differences in the parameter estimates between tissues and species were judged from the overlap of 95% confidence intervals. The differences between the bromadiolone quantity and concentration in different tissues according to the sex of the specimen were checked by a comparison of the 95% confidence intervals calculated from bootstrap bias-correct adjusted (BCa) limits (1000 permutations) on the standard deviation of the predicts (Wehrens et al., 2000). The relationship between the bromadiolone concentrations or quantities in vole tissues and the age of the individuals was verified by using the General Linear Model. Analyses were performed using R 2.4.1 (R Development Core Team, 2004).

## 4. Results

### 4.1 Rodent sampling and population density estimation

One hundred and eighty eight animals were trapped in the study area.

*Underground trapping* - Ninety four water voles were trapped, and one water vole was accidentally found dead in its burrow (although these were not normally searched). After six days, the number of water voles caught per trap decreased over time, so the sampling effort was gradually increased 2-fold until D9 and then 10-fold on D20 of the experiment. After D28, the efficiency seemed to increase from 0.04 to 0.2 rodents caught per trap.

*Aboveground trapping* - Sixty eight common voles and five water voles were trapped. The carcasses of fourteen common voles and one water vole were collected. Two common voles were collected in a moribund state. The sampling effort was identical throughout the experiment; however, the sampling efficiency was higher at the beginning, as 91% of the common voles and 80% of the water voles were captured during the first 16 days.

### 4.2 Kinetics of bromadiolone residues in rodent populations

No bromadiolone residues were found in the eight rodents trapped before the treatment.

*Underground trapping* - Eighty eight of the 94 water voles trapped underground (94%) contained detectable bromadiolone residues. On the first day after treatment, four of the six water voles trapped underground (67%) exhibited residues in all three tissues analyzed. Following the second day, all of the trapped water voles (n=78) accumulated residues in their tissues for 50 days, except for one specimen which was trapped at D13. Although the maximal concentration of bromadiolone in tissues was registered on D5, even at D135, eight of the ten water voles (80%) had detectable residues in at least one tissue, with three specimens having residues in three tissues, four having residues only in the liver and digestive tract, and one having residues only in the liver. Among the water voles trapped 135 days after treatment, one presented a high bromadiolone concentration (1.43, 16.63, 0.15 and 0.86 mg/kg in the whole body, liver, carcass, and digestive tract, respectively) close to that observed on D1 and D18-D20.

At the population level, the kinetic model adapted from Widianarko and Van Straalen (1996) describes a dramatic increase of bromadiolone residues in different tissues during the first days (Figure 18). Bromadiolone concentrations reached the maximum level between day 4.0 and day 6.5 according to tissues for the models fitted with the  $k_{0 \text{ galleries}}$ , and between day

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

3.3 and day 5.6 for the models fitted with the  $k_{0 \text{ storages}}$ . Whatever the modality, the digestive tract is the organ in which the maximal predicted concentrations are reached the earliest, whereas the liver is the organ in which it happens the latest. The kinetic data show a gradual decrease until D135 (Figure 18). The parameters estimated and maximum values modeled are listed in Table 7. According to these estimates, no matter the  $k_0$ , the assimilation rate ( $a$ ) is higher in the liver than in the digestive tract, and lower in the carcass (table 1). Therefore, at the population level, the liver assimilates bromadiolone more quickly (e.g. 25.8 and 7.7 times more quickly than in carcass and the digestive tract, respectively). The liver eliminates the bromadiolone slower than the digestive tract ( $k_2$  is 2.4 times lower) when the data are fitted with the  $k_{0 \text{ galleries}}$ . In spite of an elimination rate of up to 2.2 fold smaller in the liver than in the digestive tract, when the data are fitted with the  $k_{0 \text{ storages}}$ , no statistical differences were found.

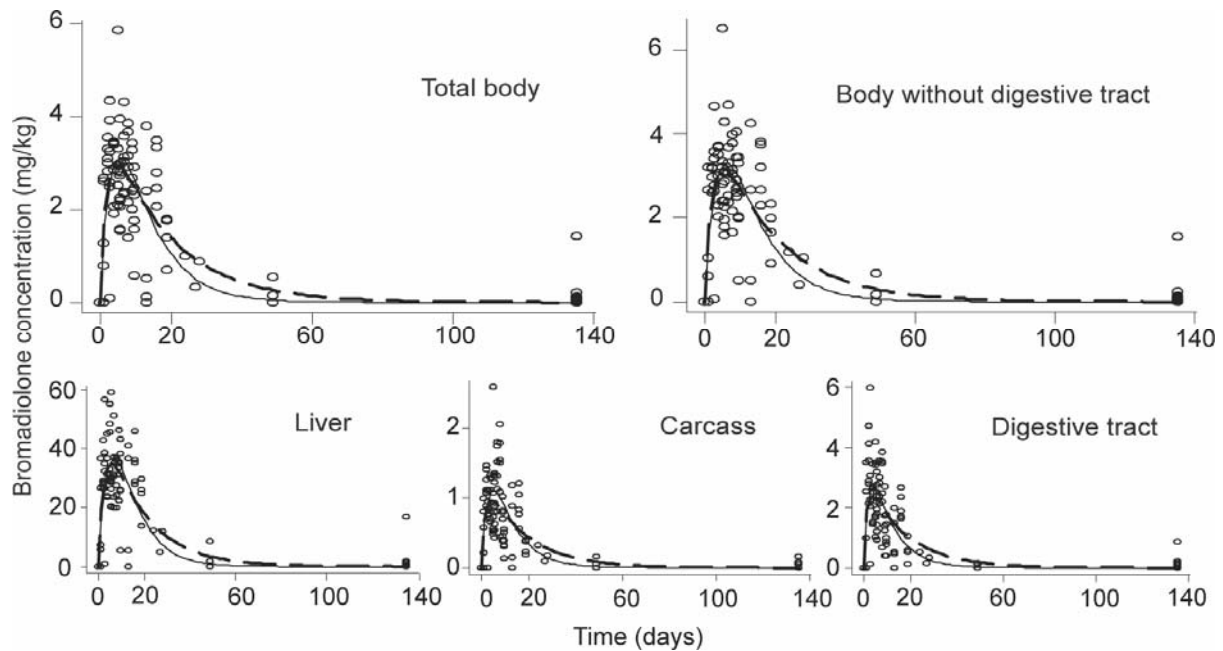


Figure 18. Bromadiolone concentrations in the 96 water voles trapped underground. Dotted line: model fit under the hypothesis of voles feeding exclusively in storage, dark line: model fit under the hypothesis of voles feeding exclusively in galleries.

The comparison between the two modalities (galleries and storages) did not exhibit statistical differences for parameters of a given tissue (Table 7). However, the kinetic parameters ( $a$  and  $k_2$ ) exhibit higher values (in average  $26 \pm 4$  and  $88 \pm 8$  % respectively) when  $k_{0 \text{ storages}}$  were taken into account, rather than  $k_{0 \text{ galleries}}$ . This may explain why predicted values using the  $k_{0 \text{ storages}}$  parameter are graphically lower than those estimated by using the  $k_{0 \text{ galleries}}$  at the time of maximal concentration, but are higher during the phase of concentration decrease (Figure 18). This may also serve to explain why bromadiolone persists longer in all tissues when the situation of bait consumption in storages is retained.

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

		<b>a</b> (mg/kg <sub>tissue</sub> /d)	min/max	p-value	<b>k<sub>2</sub></b> (d <sup>-1</sup> )	min/max	p-value	r <sup>2</sup>	<b>Time of maximum concentrations calculated (d) (and maximum value modeled) (mg/kg<sub>tissue</sub>)</b>
<i>k<sub>0</sub> galleries</i>	<b>Whole b.</b>	1.62 <sup>a</sup>	1.23/2.01	<0.001	0.29 <sup>a,b</sup>	0.20/0.38	<0.001	0.54	5.5 (3.1)
	<b>Liver</b>	15.05 <sup>b</sup>	11.84/18.27	<0.001	0.21 <sup>a</sup>	0.14/0.27	<0.001	0.51	6.5 (36.3)
	<b>Carcass</b>	0.62 <sup>c</sup>	0.44/0.79	<0.001	0.33 <sup>a,b</sup>	0.23/0.43	<0.001	0.46	5.1 (1.1)
	<b>D.t.</b>	2.04 <sup>a</sup>	1.28/2.80	<0.001	0.50 <sup>b</sup>	0.30/0.69	<0.001	0.48	4.0 (2.7)
	<b>Body without D.t.</b>	1.52 <sup>a</sup>	1.17/1.86	<0.001	0.24 <sup>a,b</sup>	0.17/0.31	<0.001	0.56	6.1 (3.3)
<i>k<sub>0</sub> storages</i>	<b>Whole b.</b>	2.13 <sup>a</sup>	1.42/2.85	<0.001	0.55 <sup>a</sup>	0.35/0.75	<0.001	0.57	4.6 (3.0)
	<b>Liver</b>	19.48 <sup>b</sup>	13.69/25.27	<0.001	0.41 <sup>a</sup>	0.26/0.55	<0.001	0.54	5.6 (34.9)
	<b>Carcass</b>	0.76 <sup>c</sup>	0.44/1.08	<0.001	0.61 <sup>a</sup>	0.34/0.88	<0.001	0.45	4.3 (1.0)
	<b>D.t.</b>	2.53 <sup>a,c</sup>	1.06/4.01	0.001	2.88 <sup>a</sup>	0.35/1.41	0.002	0.47	3.3 (2.37)
	<b>Body without D.t.</b>	1.99 <sup>a</sup>	1.36/2.62	<0.001	0.47 <sup>a</sup>	0.30/0.64	<0.001	0.50	5.1 (3.2)

Minimum and maximum values are likelihood-based 95% confidence intervals. For one parameter, within the same *k<sub>0</sub>*, values that share similar letters are not significantly different.

Table 7. Estimates of kinetic parameters for bromadiolone persistence in the water vole population trapped underground after a field treatment. Parameters are presented for the whole body (Whole b.) and each tissue: liver, carcass, and digestive tract (D.t.), with the rate constant *k<sub>0</sub>* being estimated in treatment galleries and in storage cavities.

Age does not influence bromadiolone concentration in whole body, liver, carcass, or digestive tract (ANOVA,  $p > 0.05$ ). The overall sex ratio was 1.14 for water voles trapped underground (50 males/44 females). No differences in concentration in the whole body, liver, and digestive tract were found between sexes (bootstrap BCa limit comparison,  $p > 0.05$ ), but bromadiolone concentrations in female carcasses were found to be higher than in males (bootstrap BCa limit comparison,  $p = 0.036$ ).

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

*Aboveground trapping* - Twenty eight of the 69 common voles trapped aboveground (41%) and one of the five water vole (20%) contained detectable bromadiolone residues (Figure 19).

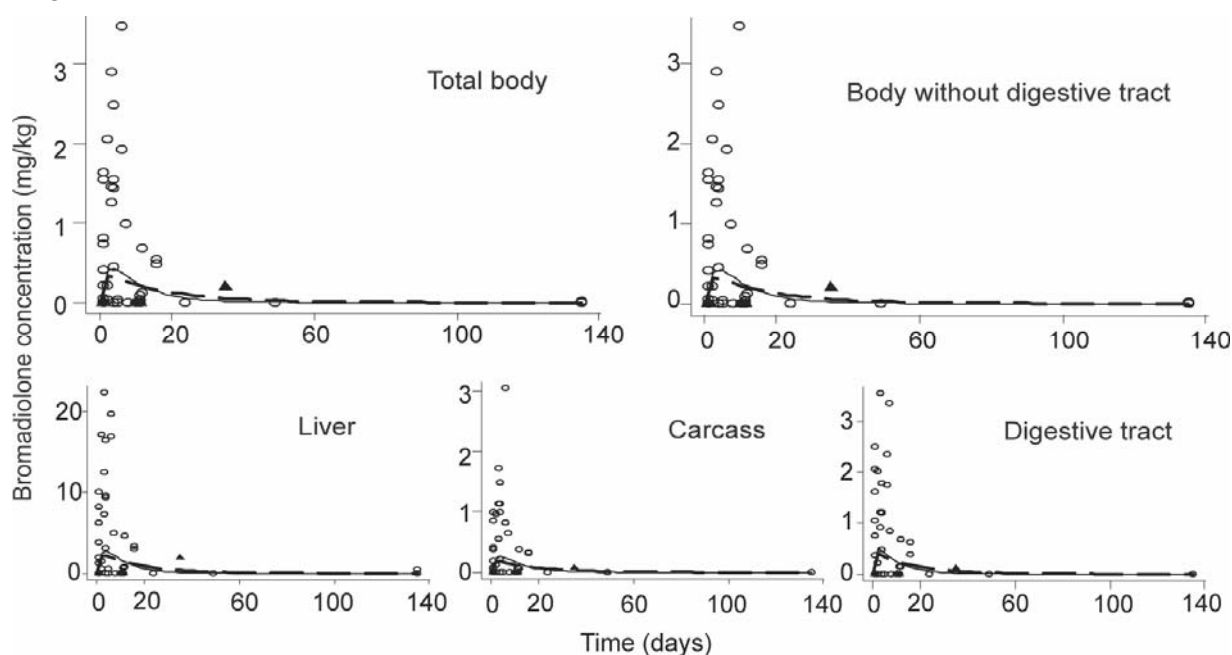


Figure 19. Bromadiolone concentration in the 69 common voles (O) and in the five water voles (▲) trapped aboveground. Dotted line: model fit under the hypothesis of voles feeding exclusively in storage, dark line: model fit under the hypothesis of voles feeding exclusively in galleries.

On the first day after treatment, six common voles of the 21 trapped (29%) had residues in the three tissues analyzed. From D2 to D7, 12 of the 22 common voles trapped (55%) had residues in three tissues and two had residues only in the liver. The measured concentrations are on average 1.9 fold higher than those measured at D1. From D8 to D35, only four of the 26 common voles trapped (15%) have residues (two trapped at D11 and D135 only in the liver, one trapped at D11 only in the digestive tract and carcass). The measured concentrations are on average 2.8 fold lower than those measured at D1. Of the five water voles trapped aboveground (Figure 19) (one at D1, one at D10, two at D11 and one at D35), only the individual trapped on D35 (20%) had residues in its tissues (Figure 19). The few individual data and the numerous values (59%) with no detectable residues may explain the fact that several parameters of the models are not significantly different from zero, and that the model explains a low fraction ( $r^2$  ranged from 0.01 to 0.08) of the total variation (Table 8). The bromadiolone concentrations in water voles and common voles trapped aboveground showed a dramatic increase during the first 1.3 or 3.7 days according to tissues and  $k_0$  parameters, and then, decreased gradually. The time of maximum calculated concentrations and maximum values modeled are presented in Table 8. The overall sex ratio was 1.3 for common voles trapped aboveground (39 males/30 females), and

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

2.5 for those collected dead (ten males/four females). The two moribund specimens were females. We failed to detect sex and age effects on bromadiolone concentration in any tissues (bootstrap BCa limit comparison,  $p > 0.05$  for sex and ANOVA  $p > 0.05$  for age). Whatever the tissue, bromadiolone concentrations were lower in common voles trapped aboveground than in water voles trapped underground, and in most of the cases the assimilation rate of the common vole was lower than for the water vole, while the elimination rate was not significantly different.

		<b>a</b> (mg/kg <sub>tissue</sub> /d)	<b>min/max</b>	<b>p-value</b>	<b>k<sub>2</sub></b> (d <sup>-1</sup> )	<b>min/max</b>	<b>p-value</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Time of maximum concentrations calculated (d) (and maximum value modeled) (mg/kg<sub>tissue</sub>)</b>	
<i>k<sub>0</sub> galleries</i>	<b>Whole b.</b>	0.43 <sup>a</sup>	-0.01/0.86	0.058	0.69 <sup>a</sup>	-0.07/1.44	0.078	0.07	3.2 (0.4)	
	<b>Liver</b>	2.48 <sup>a</sup>	0.14/4.81	0.042	0.62 <sup>a</sup>	-0.02/1.26	0.063	0.06	3.5 (2.8)	
	<b>Carcass</b>	0.21 <sup>a</sup>	0.03/0.39	0.026	0.54 <sup>a</sup>	0.01/1.06	0.049	0.06	3.7 (0.3)	
	<b>D.t.</b>	0.82 <sup>a</sup>	-0.59/2.23	0.262	1.27 <sup>a</sup>	-0.99/3.53	0.275	0.08	2.1 (0.5)	
	<b>Body without D.t.</b>	0.39 <sup>a</sup>	0.03/0.74	0.039	0.61 <sup>a</sup>	-0.01/1.23	0.057	0.05	3.5 (0.4)	
<i>k<sub>0</sub> storages</i>	<b>Whole b.</b>	0.53 <sup>a</sup>	-0.75/1.81	0.420	1.38 <sup>a</sup>	-2.06/4.83	0.433	0.01	2.4 (0.3)	
	<b>Liver</b>	2.91 <sup>a</sup>	-2.16/7.97	0.265	1.13 <sup>a</sup>	-1.01/3.28	0.305	0.01	2.8 (2.2)	
	<b>Carcass</b>	0.26 <sup>a</sup>	-0.36/0.88	0.406	1.23 <sup>a</sup>	-1.72/4.17	0.419	-0.01	2.6 (0.2)	
	<b>D.t.</b>	1.40 <sup>a</sup>	-	12.76/15.57	0.847	3.20 <sup>a</sup>	-28.97/35.38	0.846	0.03	1.3 (0.4)
	<b>Body without D.t.</b>	0.48 <sup>a</sup>	-0.63/1.59	0.398	1.29 <sup>a</sup>	-1.78/4.35	0.414	0.02	2.5 (0.3)	

Minimum and maximum values are likelihood-based 95% confidence intervals. For one parameter, within the same  $k_0$ , values that share similar letters are not significantly different. Negative values should be biologically considered as zero values.

Table 8. Estimates of kinetic parameters for bromadiolone persistence in common vole and water vole populations trapped aboveground after a field treatment. Parameters are presented for the whole body (Whole b.) and each tissue: liver, carcass, and digestive tract (D.t.) with the rate constant  $k_0$  being estimated in treatment galleries and in storage cavities.

*Carcass collection* – All moribund animals and carcasses were found aboveground between D4 and D12 (Figure 20). All of them had residues in the three tissues analyzed. The water vole found dead in a burrow also had residues in the three tissues analyzed (Figure 20). The maximum concentration of bromadiolone in different tissues in common voles was registered five days after treatment, after which there was a gradual decrease. (Figure 20) For the period of time in which dead specimens were collected aboveground, the

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

bromadiolone concentrations in the liver were higher in intoxicated trapped common voles than in common voles collected dead aboveground (ANOVA  $p=0.01$ ). However no difference between the two groups was found for other tissues as well as for whole body concentrations.

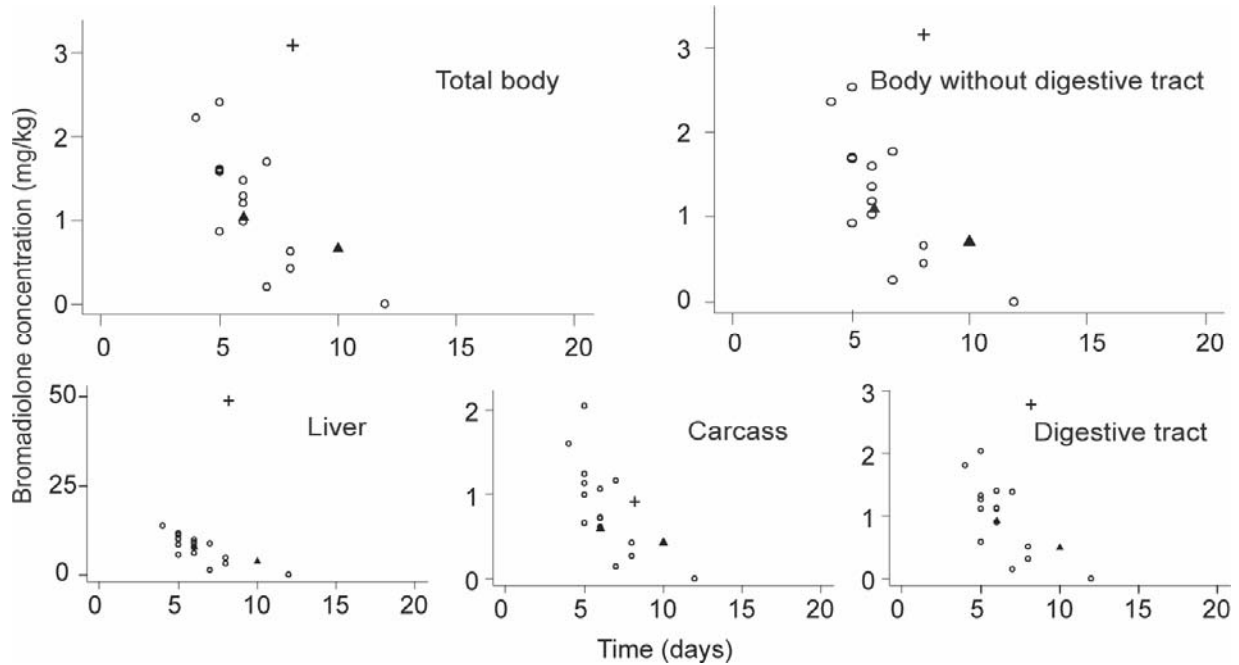


Figure 20. Bromadiolone concentration in the 14 common voles collected dead (O) or two moribund (▲) and the water vole (+) collected dead aboveground.

#### 4.3 Bromadiolone distribution in rodent tissues

The results of the bromadiolone quantity measured in rodents presenting detectable residues (those containing bromadiolone residues in at least one tissue) are presented in Figure 21.

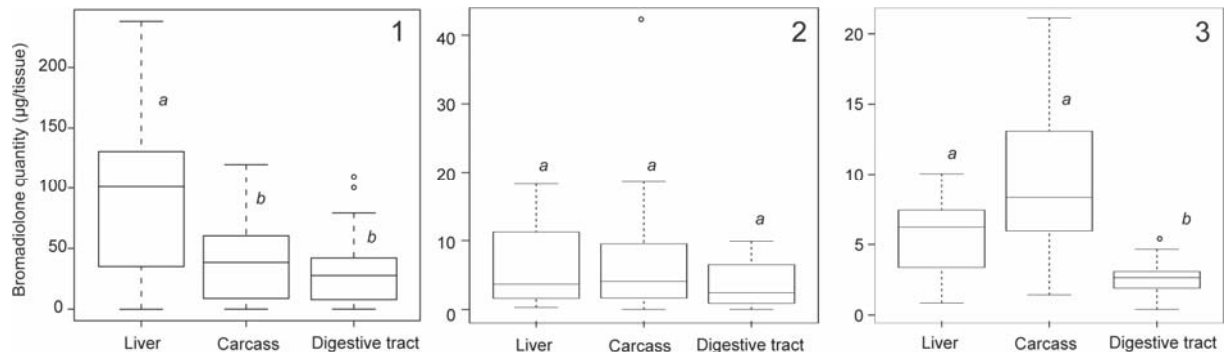


Figure 21. Bromadiolone quantity in the liver, carcass, and digestive tract of rodents presenting detectable residues: water vole trapped underground (1); common voles trapped aboveground (2) and collected dead (3). For each boxplot, the median and inter-quartile range are indicated by the horizontal line and box height, respectively. Letters a and b indicate difference between tissues for a same category (Kruskal-Wallis,  $p<0.05$ ).

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

For water voles trapped underground (Figure 21.1), liver is the organ that contains the highest quantity of bromadiolone ( $58.7 \pm 14.2\%$ ) (Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$ ), with the liver mass representing  $5.0 \pm 0.8\%$  of the total fresh body mass. No difference was observed between the quantity of bromadiolone in the carcass and digestive tract, which contained  $22.1 \pm 10.5\%$  and  $19.3 \pm 13.1\%$  respectively (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ), even though the carcass mass was larger ( $71.3 \pm 3.5\%$  and  $22.8 \pm 3.1\%$  of the total body mass respectively) (Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$ ). At the population level, the bromadiolone distribution changes over time (Figure 22). The percentage of bromadiolone contained in the liver increased during the first two weeks (ANOVA,  $p < 0.001$ ) from  $47.6 \pm 18.5$  at D1 to  $71.5 \pm 6.5\%$  at D20 and then, tended to stabilize (ANOVA,  $p < 0.05$ ) to  $69.0 \pm 15.4\%$  at D135. Different trends were observed for the carcass ( $27.5 \pm 17.5$  at D1 to  $15.6 \pm 5.5$  at D20 and  $9.0 \pm 14.7\%$  at D135) and digestive tract ( $24.9 \pm 30.4$  at D1 to  $9.3 \pm 4.5$  at D20 and  $22.9 \pm 14.3\%$  at D135). Concerning common voles trapped aboveground (Figure 21.2), no difference was observed in the percentage of bromadiolone accumulated in each tissue (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). The liver, carcass, and digestive tract contained  $42.9 \pm 22.9\%$ ,  $35.8 \pm 16.3\%$  and  $21.4 \pm 10.14\%$  of bromadiolone, respectively. In common voles collected once dead (Figure 21.3), the liver and carcass were the two tissues containing the highest quantity of bromadiolone ( $32.4 \pm 5.8\%$  and  $52.2 \pm 6.2\%$ , respectively) (Kruskal-Wallis,  $p < 0.025$ ). The percentage of mass of each tissue in common voles was of the same order as that in water voles. The liver, digestive tract, and carcass mass were  $5.5 \pm 0.7$ ;  $20.9 \pm 2.7$  and  $72.5 \pm 8.9\%$  of the total body mass, respectively. Water voles trapped underground and common voles collected dead or moribund exhibited a higher bromadiolone concentration (Wilcoxon,  $p < 0.001$ ) without a digestive tract compared to total concentrations for the whole body (on average  $+5.8\%$  and  $+3.8\%$ , respectively). However, no statistical differences were found between bromadiolone concentrations measured with or without the digestive tract in common voles trapped alive aboveground.

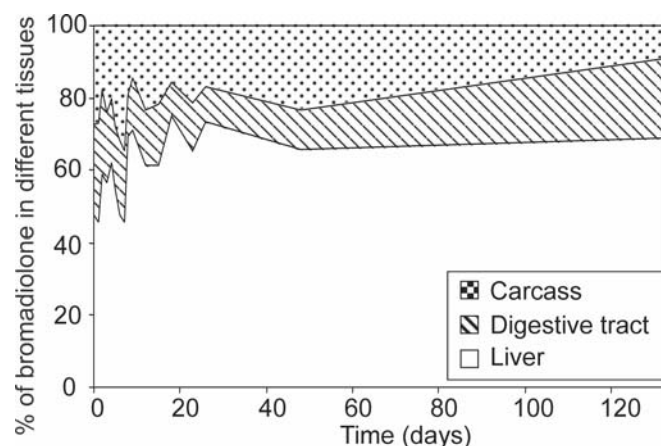


Figure 22. Evolution of the bromadiolone distribution in tissues over time in the water vole population.



## 5. Discussion

Some data are available on the residues of rodenticides in target species organisms in the laboratory (Record and Marsh, 1988). However, little information is available on the total residues of bromadiolone or other SGARs in rodents under field conditions (Giraudoux et al., 2006). Given this lack of data, Lodal and Hansen (2002) calculated the expected contents of target rodents based on a scenario of bait consumption and anticoagulant elimination. The present study describes, for the first time, the evolution over time (135 days) of the kinetics of bromadiolone residues in populations of target and non-target rodents present in the treated area and eaten by predators.

### 5.1 Rodent intoxication kinetic pattern

In our study, a large proportion of water voles trapped on D1 (67%) and 99.9% of those trapped from D2 to D50 had bromadiolone residues in their tissues. These results are in agreement with those reported by Giraudoux et al. (2006) (60% on D1, 100% during the following nine days) and demonstrate that water voles had rapid access to baits. However, during the first ten days, the mean quantity of residues in water voles was twice as high in the present study (196.5 compared to 93.5  $\mu\text{g}/\text{ind}$ ). Our results for the residue levels in the carcass and digestive tract were similar to those reported by Giraudoux et al. (2006), although liver residues exceeded those reported by this previous study and were also considerably higher than those reported for other species and SGARs in the field (Delley and Joseph, 1985) and in the laboratory (Brown, 1994; Fisher et al., 2004; Atterby et al., 2005). Only the results of Poché (1988) are in accordance with ours: rats fed for one day with bromadiolone baits at 50 mg/kg contained 2.08 mg/kg of bromadiolone the next day, while, in our study, exposed water vole concentrations were on average  $1.83 \pm 0.96$  mg/kg. Common voles were found to have rapid access to baits as well, since 29% showed residues in tissues at D1. However, they were exposed to bromadiolone in a fewer number and measured concentrations were lower than for water voles. These vole species do not frequent the same burrow at the same time (Le Louarn and Quéré, 2003) and it is possible that differences in their dietary behavior or metabolism affect the residues.

Despite these differences, the two species have presented the same pattern of exposure kinetics. While Giraudoux et al. (2006) have observed a relative stability of concentrations during the first 10 days, our data have exhibited non-linear kinetics characterized by a very fast concentration increase lasting until days D1.3 to D6.5, according to the tissue and species analyzed, and then followed by a gradual decrease. While the

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

carcass (muscle, bone, skin...) had a lower assimilation rate, the high affinity for liver reported in the literature at the individual level (Parmar et al., 1987) may explain similar phenomena in our study. SGARs are especially known to persist for prolonged periods in the liver (USEPA, 1998). In our study, the digestive tract was the tissue with the highest elimination rate, while liver eliminated bromadiolone slower. We observed the same exponential decline of concentrations described by Nahas et al. (1987) and Hawkins et al. (1991) in laboratory rats. The type of toxicokinetic model used to fit our data usually describes the fate of chemicals at the individual level, i.e. the processes of uptake, distribution, metabolism, and elimination in organisms after a single dose (Bernillon and Bois, 2000). Soon after an anticoagulant is ingested, it will begin to be metabolized and excreted (Record and Marsh, 1988). In our study, four processes may explain this decline. The first two express themselves at the individual level, while the last two can be related to population processes: (1) the excretion and elimination of the molecule from the body; (2) its biotransformation into metabolites; (3) the new re-colonization of rodents poisoning themselves by feeding on less concentrated baits (Sage et al., 2007) and (4) after a few days, the most poisoned rodents die and, therefore, will not be trapped. The latter two processes are probably one reason why the second phase of the exponential concentration decline was so short in our study in comparison with individual level studies (e.g. Hawkins et al., 1991).

Life-history traits weakly influenced rodent intoxication kinetics. Only sex had an influence on water vole carcass residues. Behavior might affect bait consumption and therefore the persistence at the population level but, alternatively, differences in the residue concentration might reflect toxicokinetic differences between sexes. For example, warfarin metabolism and rates of elimination were markedly different between male and female rats (Eason et al., 2002).

#### 5.2 Ecological reality of modeling

According to Widianarko and Van Straalen (1996), because the model used only three parameters, the underlying assumptions were necessarily a simplified representation of reality. One of the difficulties in our study concerned the choice of the degradation rate constant of the chemical in baits ( $k_0$ ). The prediction of a model for a rodent which eats baits alternatively in galleries and in storages should be between our two extreme scenarios, while the ideal model would take into consideration an overall  $k_0$  including two rate constants for uptake  $k_{1 \text{ galleries}}$  and  $k_{1 \text{ storages}}$  ( $d^{-1}$ ), each of them weighting the  $k_{0 \text{ galleries}}$  and  $k_{0 \text{ storages}}$ . However, rodent behavior remains unknown and these two  $k_1$  may change with time. For example,

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

rodents may eat bait more in galleries at the beginning of the treatment (bait have still not been stored), and it appears impossible to know the real values of each  $k_i$ . Moreover, the assimilation rate ( $a$ ) ideally invariant across doses and time may change with exposure, e.g., due to behavioral changes during accumulation. Rodents may feed on baits continually but they may also transport baits into storage cavities and/or eat them only when they germinate (Defaut and Sage; personal observations). Furthermore, re-colonizing rodents have access to baits later after treatment. This may explain the high variability of the data obtained. The presence of one non-intoxicated water vole trapped underground at D13, and four of the five trapped aboveground between D1 and D35, may be the consequence of a re-colonization from surrounding parcels and capture before they encountered poisoned baits. Saucy and Schneiter (1998) indicated that young water voles disperse *en masse* aboveground and these individuals were among the younger trapped (results not shown). However, to combine storage behavior and re-colonization in a model is out of reach at this time for lack of field data.

#### 5.3 Long time persistence of bromadiolone residues

Spurr et al. (2005) have already observed that residues were still present in the liver of six rats at least 24 months after brodifacoum application. In our study, in addition to a recent re-colonization, another hypothesis may explain how caught individuals still have residues in tissues at least 135 days after treatment. These individuals may have either ingested a non lethal dose or be less sensitive to a given dosage. However, determining the relationship between an exposure and the resulting dose in target tissue is a critical issue encountered in quantitative risk assessment (Bernillon and Bois, 2000). Accumulation of carcass concentrations could be the result of intermittent or repeated exposure to sub-lethal doses and subsequent tissue accumulation, and this does not necessarily infer anything about toxicity.

Giraudoux et al. (2006) have suggest that the persistence of high residues in the digestive tract for a long time reflects that active baits may be consumed for long periods after treatment. In our study, and particularly for one specimen, high concentrations in the total body, including the digestive tract were observed up to 135 days. However, our results and those of Giraudoux et al. (2006) concerning the digestive tract include intestinal contents and tissues. Therefore, the bromadiolone concentration in digested food cannot be separated from its persistence in tissues, preventing us from estimating the real time to intoxication. Moreover, the mechanism of anticoagulant metabolism and excretion are poorly

known (Atterby et al., 1999) and to our knowledge, no data are available concerning the duration of the excretion period.

#### **5.4 Bromadiolone distribution in tissues**

Assimilation rates that were higher, and elimination rates that were lower, in the liver than in other tissues have led to higher concentrations of bromadiolone being measured in this organ. Giraudoux et al. (2006) have observed that the liver contributed to only 25% of the total bromadiolone quantity in a water vole body, while, in our study, the proportion was 2.4 times higher, accounting for 59% of the total bromadiolone. For common voles collected dead, the digestive tract contains the smallest quantity of bromadiolone. This may indicate that just before dying, common voles decrease their activity and they do not ingest baits (Brakes and Smith, 2005). No differences were observed between the concentrations measured in the population trapped alive and those of specimens collected dead, except in the liver where the concentration of trapped common voles was found to be 1.8 times higher than that measured in dead specimens. As suggested by Grolleau et al. (1989), one can hypothesize that the bromadiolone degradation by micro-organisms after death had already begun.

#### **5.5 Implications for predator exposure**

In addition to the kinetics of residues in rodent populations, the bromadiolone available for predators over time may be determined by several factors, such as:

*Evolution of rodent density* - Underground, the trapping efficiency may be related to the evolution of the water voles density. The frequent checking of traps limited the non-availability of traps and the “trap engaged effect” (Weihong et al., 1999), making the number of voles trapped each day negligible in comparison with the population density estimation before treatment. The dramatic increase of the trapping effort after the first 6-7 days reflects the diminution in rodent population density and corresponds to the maximum rodent mortality observed by Grolleau et al. (1989) between five and ten days after the first bromadiolone ingestion. Between D20 and D50, the trapping efficiency was very low, suggesting that the treatment was effective and that live preys are lower for predators. After D50, the presence of 40 cm of snow in the study site prevented the capture of specimens by surface predators and allowed vole population movements from surrounding parcels. Re-colonization might explain the relative increase in trapping efficiency at the end of the experiment. Common

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

vole specimens were released when a sufficient number was trapped for residue analysis. As the only information we kept was the number of specimens analyzed, we could not estimate the density variation over time for this species. However the intoxication and the death of common voles showed that the water vole control reduced the local population of non-target rodent species and may limit the food availability of some specialist predators (e.g. Least Weasel, *Mustela nivalis*) or lead to the exposure of predators that do not eat water voles.

*Prey accessibility* – The likelihood of a rodent being fed upon by predators or scavengers is a critical determinant in the matter of secondary hazard (Brakes and Smith, 2005). For predators which do not consume carcass but prefer living prey, we showed that exposure is maximal during 6-7 days but is continuous all throughout the experiment. For surface scavengers, the exposure appears occurred to between D4 and D12, when mortality in the two species was observed aboveground but is probably not limited to this period. SGARs such as bromadiolone are generally defined as single-feeding rodenticides (Kolf-Clauw et al., 1995). However, because of the slow onset of their action and their high persistence in baits (Sage et al., 2007), rodents may continue feeding and will eat more than a LD before dying, thus potentially increasing residues. The time to death after ingestion may permit the rodents to seek cover when they fall ill (Record and Marsh, 1988), and, as previously discussed, to be less available to surface predators. On the other hand, Saucy et al. (2001) demonstrated that 38% of poisoned water voles died aboveground instead of in their underground tunnels. In our study, we saw that results were different and this behavior differed among rodent species. Birds of prey such as buzzards have limited access to water vole, i.e., the most poisoned species, while predators such as mustelids and foxes can have direct access to them underground. Furthermore, even if concentrations are not more important in moribund specimens, their reduced escape response could increase the proportion of contaminated individuals in the diet and the likelihood of ingesting a harmful dose (Cox and Smith, 1992).

*Bromadiolone distribution in the rodent body* - The rejection of the digestive tract, where bromadiolone was at low concentrations, by some scavenging species (Delattre, 1987; Artois, 1989) may provide a moderate degree of risk increase for secondary poisoning while they feed primarily on the liver, the most concentrated tissue and the one where bromadiolone accumulation rate was the most important over time. Our results contrast with those reported by Giraudoux et al. (2006) who described a concentration decrease of 12.79% when the digestive tract is discarded. Our study demonstrates a concentration increase from 3.8 to 5.8%.

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

#### *Exposure simulation and risk assessment for predators: the case of the Red fox –*

The high bromadiolone concentration in 96% of water voles and 51% of common voles is clearly a hazard for their predators. By considering those previous factors influencing bromadiolone availability, the residues in rodent tissues were maximal between three to six days after bait distribution, but the risk appeared maximal during the first 15 – 20 days. In order to assess the risk for Red foxes that could feed on a treated parcel after a control operation, a “worst case” scenario was developed as follows. We assumed that adult Red foxes ate between 0.3 and 0.6 kg of food per day (Artois, 1989). According to Weber and Aubry (1993), they may feed on water vole exclusively during high-density peaks. If those foxes feed on water vole trapped underground exclusively, they may ingest between 0.13-0.25 or 0.14-0.27 mg of bromadiolone per kg of body mass per day on average, depending on if they feed on all the rodent body or if they discard the digestive tract, respectively. Foxes feeding only on live rodents trapped aboveground will ingest on average 0.020-0.041 or 0.021-0.042 mg of bromadiolone per kg of body mass per day. Foxes feeding only on moribund or dead rodents will ingest on average 0.067-0.127 or 0.067-0.133 mg of bromadiolone per kg of body mass per day. As no toxicity parameters for bromadiolone were available for foxes (USEPA, 1998; Erickson and Urban, 2002; AGRITOX INRA, 2004), we compared the ingested doses of bromadiolone calculated above to the LD<sub>50</sub> of 10 mg/kg established for dogs (USEPA, 1998). However, SGARs are more toxic when ingested for several consecutive days because repeated ingestion did not allow the animals to recover from the effects of the precedent doses (Kolf-Clauw et al., 1995). If the concentrations observed aboveground are less important, the values for water voles trapped underground are near the acute LD<sub>50</sub> after five days of exposure for dogs (0.50 mg/kg/day, Petterino and Paolo, 2001), and are generally higher than the lowest lethal dose, 0.15 mg/kg/day for five days (Kolf-Clauw et al., 1995). Moreover, the risk is magnified by the persistence of the compound in the rodent population for at least 4.5 months, which could lead to accumulation following repeated exposure. In this regard, it is important to remember that a sub-lethal dose well below the LD will produce significant clotting abnormalities and some hemorrhaging (Eason et al., 1996). Furthermore, while toxicity such as LD<sub>50</sub> on dogs is mostly obtained under laboratory conditions, with animals housed individually and reduced movements, field conditions may increase the risk of severe bleeding, thereby increasing the toxicity of rodenticides (Petterino and Paolo, 2001; European Commission, 2002; Berny et al., 2006). Moreover, the risk for non-target species may considerably increase with time since high-rodent-density peaks are maintained for months (Giraudoux et al., 1997). This study was carried out in a parcel of 4ha, but field control operations are undertaken on larger areas (i.e. 60000ha treated in 1998/1999 (SAGIR 2000)). On the level of a predator hunting area, all bromadiolone treatments are not performed at the same time by farmers (e.g. there are

several weeks between control operations of water vole in the same village). This results in a prolonged exposure period for non-target species.

## 6. Conclusion

Previous studies have focused only on exposure of individuals. However, for a full understanding of the consequences of using rodenticides, processes at the population level have to be investigated complementarily. For the first time, the kinetics of bromadiolone residues on the two rodent populations present on treated areas was monitored extensively after field treatment. A mathematical model of the rodent-body residue was built as required for risk-assessment studies (Erickson and Urban, 2002), and without considering prey/predator interactions, allowed a simulation of the bromadiolone available for secondary poisoning. Processes other than the metabolism of the specimens, such as the re-colonization and exposure of rodents living in surrounding areas, the death of the most poisoned specimens, and/or the fate of bromadiolone in the environment (soil, baits...), may influence the residue kinetics at the population level. To date, laboratory experiments (i.e. Grolleau et al, 1989) were in contradiction with massive secondary poisoning hazards regularly reported during the past 20 years (SAGIR, 1990-2006; Berny, 2007). Our study clearly and realistically indicates that an important risk of non-target species poisoning does exist during the first 15-20 days, and can be prolonged for longer times (until at least 135 days) after field control operations.

## 7. Acknowledgements

This study received support from the *Conseils généraux* of the Doubs and the Jura departments and from the *Région of Franche-Comté*. We are grateful to B. Barbier and B. Videmann of the ENVL, D. Truchetet of the *Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt*, S. Bagnoud of the *Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles* and to G. Cordier, farmer of the *Zone Expérimentale de Lute Anti Campagnols* for their participation and technical support.

## 8. References

- AGRITOX INRA. Fiche d'information sur les substances actives phytopharmaceutiques - Bromadiolone / Lipha. <http://www.inra.fr/aritox>, 2004.
- Alterio N, Moller H, Brown K. Trappability and densities of stoats (*Mustela erminea*) and ship rats (*Rattus rattus*) in a South Island Nothofagus forest, New Zealand. *N Z J Ecol* 1999;23:95-100.
- Artois M. Le Renard roux (*Vulpes vulpes Linnaeus*, 1758). In: Artois M, Delattre P, editors. Encyclopédie des carnivores de France, SFEPM, Nort/Erdre, 1989, p. 90.
- Atterby H, Kelly MJ, MacNicoll AD. Difenacoum resistance in rats is not a consequence of increased metabolism and excretion. Second European Vertebrate Pest Management Conference. Braunschweig, Germany, 1999.
- Atterby H, Kerins GM, MacNicoll AD. Whole-carcass residues of the rodenticide difenacoum in anticoagulant-resistant and -susceptible rat strains (*Rattus norvegicus*). *Environ Toxicol Chem* 2005;24:318-323.
- Barnett EA, Fletcher M, Hunter K, Taylor MJ, Sharp AE. Pesticide poisoning of animals in 2006 - Investigations of suspected incidents in the United Kingdom. London: Defra, 2006.
- Bernillon P, Bois FY. Statistical issues in toxicokinetic modeling: a bayesian perspective. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 5:883-893.
- Berny P. Pesticides and the intoxication of wild animals. *J Vet Pharmacol Ther* 2007;30:93-100.
- Berny P, Gaillet JR. Acute poisoning of Red Kites (*Milvus milvus*) in France: Data from the SAGIR network. *J Wildl Dis* 2008;44:417-426.
- Berny P, de-Oliveira L, Videmann B, Rossi S. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *Am J Vet Res* 2006;67:363-371.
- Berny PJ, Buronfosse T, Buronfosse F, Lamarque F, Lorgue G. Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere* 1997;35:1817-1829.
- Brakes C, Smith R. Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *J Appl Ecol* 2005;42:118-128.
- Brown RA. Assessing the environmental impacts of rodenticides. In: Buckle AP, Smith RH, editors. Rodent pests and their control. CAB International, University Press, Cambridge, UK, 1994, 363-380.



### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

- Burnham KP, Anderson DR. Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. *Sociological Methods Research* 2004;33:261-304.
- Cox P, Smith RH. Rodenticide ecotoxicology: Pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. In: Borrecco JE, Marsh RE, editors. *Proceedings of the 15th Vertebrate Pest Conference*. University of Nebraska; Lincoln: Printed at Univ. of California, 1992.
- Delattre P. La belette et l'hermine. In: Artois M, Delattre P, editors. *Encyclopédie des carnivores de France*, SFEPM, Nort/Erdre, 1987, 73.
- Delley B, Joseph E. Prévention des pullulations de campagnols terrestres en prairie de montagne - acquis récents et perspectives de développement d'appâts rodenticides. *Recherche agronom. en Suisse* 1985;24:121-178.
- Eason CT, Murphy EC, Wright GRG, Spurr EB. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology*. 2002;11:35-48.
- Eason CT, Wright GRG, Batcheler D. Anticoagulant effects and the persistence of brodifacoum in possums (*Trichosurus vulpecula*). *N Z J Agric Res* 1996;39:397-400.
- Erickson W, Urban D. Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mammals: a Comparative Approach. Washington DC., United States Environmental Protection Agency, 2002.
- European Commission. Guidance document on risk assessment for birds and mammals under council directive 91/414/EEC - Working document, Health & consumer protection directorate-general, 2002.
- Fisher P, O'Connor C, Wright G, Eason CT. Anticoagulant residues in rats and secondary non-target risk, *Doc Science Internal Series*, 2004.
- Fournier-Chambrillon C, Berny P, Coiffier O, Barbedienne P, Dassé B, Delas G, et al. Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implication for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *J Wildl Dis* 2004;40:688-695.
- Giraudoux P, Delattre P, Habert M, Quere JP, Deblay S, Defaut R, et al. Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris scherman*): a land usage and landscape perspective. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 1997;66:47-60.
- Giraudoux P, Pradier B, Delattre P, Deblay S, Salvi D, Defaut R. Estimation of water vole abundance by using surface indices. *Acta Theriol* 1995;40:77-96.
- Giraudoux P, Tremolières C, Barbier B, Defaut R, Rieffel D, Bernard N, et al. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environ Res* 2006;102:291-298.
- Grolleau G, Lorgue G, Nahas K. Toxicité secondaire, en laboratoire, d'un rodenticide anticoagulant (bromadiolone) pour des prédateurs de rongeurs champêtres: Buse variable (*Buteo buteo*) et Hermine (*Mustela erminea*). *Bulletin OEPP/EPPO* 1989;19:633-648.

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

- Hawkins D, Brodie R, Clarke D. Determination of the Residues and the Half-Life of the Rodenticides Brodifacoum, Bromadiolone, and Flocoumafen in the Livers of Rats During 200 Days after a Single Oral Dose of Each at a Dose Level of 0.2 mg/kg, 1991.
- Hunter K. <sup>a</sup> Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. I. Fluorescence detection using post-column techniques. *J Chromatogr* 1983a;270:267-276.
- Hunter K. <sup>b</sup> Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. II. Fluorescence detection using ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 1983b;270:277-283.
- Janova E, Heroldova M, Nesvadbova J, Bryja J, Tkadlec E. Age variation in a fluctuating population of the common vole. *Oecologia* 2003;137:527-532.
- Kolf-Clauw M, Alvarez E, Matray O. Anticoagulant rodenticides : étiologie, diagnostic et traitement des intoxications. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 1995;Spécial toxicologie des carnivores domestiques:127-134.
- Le Louarn H, Quéré JP. *Les Rongeurs de France : Faunistique et Biologie*. INRA, editors. Paris, France, 2003, 256 pp.
- Lodal J, Hansen OC. Human and environmental exposure scenarios for rodenticides – focus on the Nordic Countries. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 2002.
- Martinet L. Détermination de l'âge chez le campagnol des champs (*Microtus arvalis Pallas*) par la pesée du cristallin. *Mammalia* 1966;30:425-430.
- McDonald RA, Harris S, Turnbull G, Brown P, Fletcher M. Anticoagulant rodenticides in stoats (*Mustela erminea*) and weasels (*Mustela nivalis*) in England. *Environ Pollut* 1998;103:17-23.
- Merson MH, Byers RE, Kaukeinen DE. Residues of the rodenticide brodifacoum in voles and raptors after orchard treatment. *J Wildl Manag* 1984;48:212-216.
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Arrêté ministériel du 17 décembre 2001 relatif aux conditions d'emploi de la bromadiolone pour la lutte contre le Campagnol terrestre. *J.O.* 2002;n° 25 du 30 janvier 2002:p. 2015.
- Murphy EC, Clapperton BK, Bradfield PMF, Speed HJ. Brodifacoum residues in target and non-target animals following large-scale poison operations in New Zealand podocarp-hardwood forests. *N Z J Zool* 1998;25:307-314.
- Nahas K. Kinetics of bromadiolone, anticoagulant rodenticide, in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Pharmacological Research Communications* 1987;19:767-775.
- Newman MC. *Population ecotoxicology*. Toronto: John Wiley & Sons Canada, 2001, 226 pp.
- Parmar G, Bratt H, Moore R, Batten PL. Evidence for a common binding site in vivo for the retention of anticoagulants in rat liver. *Human Toxicology* 1987;6:431-432.
- Petterino C, Paolo B. Scientific reviews - Toxicology of various anticoagulant rodenticides in animals. *Vet. Human Toxicol* 2001;46:353-360.

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

- Pineiro JC, Bates DM. Mixed-Effects Models in S and S-Plus. Springer-Verlag, editors. New York, 2000, 528 pp.
- Poché RM. The status of bromadiolone in the United States. In: Salmon TP, ed. Proceedings Twelfth Vertebrate Pest Conference. Davis, California, 1986.
- Poché RM. Rodent tissue residue and secondary hazard studies with bromadiolone. Bulletin OEPP/EPPO 1988;18:323-330.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. ISBN 3-900051-00-3 Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2004.
- Raoul F, Michelat D, Ordinaire M, Decote Y, Aubert M, Delattre P, et al. *Echinococcus multilocularis*: secondary poisoning of fox population during a vole outbreak reduces environmental contamination in a high endemicity area. Int J Parasitol 2003;33:945-954.
- Record CR, Marsh RE. Rodenticide residues in animal carcasses and their relevance to secondary hazards. In: Crabb AC, Marsh RE, editors. Proceedings of the 13th Vertebrate Pest Conference, 1988, 163-168.
- Sage M, Coeurdassier M, Defaut R, Lucot E, Barbier B, Rieffel D, et al. How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*? Environ Pollut 2007;148:372-379.
- SAGIR. Traitement de campagnols aux anticoagulants. Evaluation de la mortalité de la faune non cible dans le Doubs. Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage. Doubs, France, 1990-2006.
- Sakamoto Y, Ishiguro M, Kitagawa G. Akaike Information Criterion Statistics. D. Reidel Publishing Company 1996.
- Saucy F, Meylan A, Poitry R. Lessons from 18 years of use of anticoagulants against fossorial *Arvicola terrestris* in switzerland. In: Pelz J, Cowan P, Feare C, editors. Advances in vertebrate pest management II. Filander Verlag, Fürth, 2001, 71-90.
- Saucy F, Schneiter B. Juvenile dispersal in the vole *Arvicola terrestris* during rainy nights: a preliminary report. Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. 1998;84:333-345.
- Shore RF, Birks JDS, Afsar A, Wienburg CL, Kitchener AC. Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. Environ Pollut 2003;122:183-193.
- Shore RF, Birks JDS, Freestone P. Exposure of non-target vertebrates to second-generation rodenticides in Britain, with particular references to the polecat *Mustela putorius*. N Z J Ecol 1999;23:199-206.
- Siegel S, Castellan NJ. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York: Mc Graw-Hill International, 1988, 399 pp.
- Sokal PR, Rohlf FJ. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. New York, USA: W. H. Freeman and Compagny, 1997, 880 pp.

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

- Spurr EB, Maitland MJ, Taylor GE, Wright GRG, Radford CD, Brown LE. Residues of brodifacoum and other anticoagulant pesticides in target and non-target species, Nelson Lakes National Park, New Zealand. *N Z J Zool* 2005;32:237-249.
- Stone WB, Okoniewski JC, Stedelin JR. Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J Wildl Dis* 1999;35:187-193.
- USEPA. Registration Eligibility Decision (RED) Rodenticide Cluster. EPA 738-R-98-007. United States EPA, editors. United States: Environmental Protection Agency, 1998, 296 pp.
- Walker LA, Turk A, Long SM, Wienburg CL, Best J, Shore RF. Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Sci Total Environ* 2008;392:93-98.
- Weber JM, Aubry S. Predation by foxes, *Vulpes vulpes*, on the fossorial form of the water vole, *Arvicola terrestris scherman*, in western Switzerland. *J Zool (Lond)* 1993;229:553-559.
- Wehrens R, Putter H, Buydens LMC. The bootstrap: a tutorial. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 2000;54:35-52.
- Weihong J, Veitch CR, Craig JL. An evaluation of the efficiency of rodent trapping methods: the effect of trap arrangement, cover type, and bait. *N Z J Ecol* 1999;23:45-51.
- WHO - World Health Organization. Anticoagulant Rodenticides - Environmental Health Criteria 175. Geneva, International Programme on Chemical Safety, 1995.
- Widianarko B, Van Straalen N. Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals. *Environ Toxicol Chem* 1996;15:402-406.

## 9. En Bref

Après le traitement, les résidus dans les Campagnols terrestres atteignent rapidement des valeurs maximales et le risque maximum pour un prédateur se nourrissant sur une parcelle apparaît dans les 15 - 20 premiers jours.

Près de 50% des Campagnols des champs capturés présentent des résidus de bromadiolone. Cette espèce a été principalement capturée en surface et présente de ce fait une exposition accrue pour les prédateurs de type rapace.

Les prédateurs délaissant le tube digestif présentent un risque modérément plus élevé d'ingérer une quantité de bromadiolone supérieure par rapport à ceux ingérant la totalité du corps des rongeurs.

La quantité de bromadiolone absorbée par un renard ingérant des proies capturées en profondeur pendant les 15-20 premiers jours est très proche de la  $DL_{50}$  chez le chien après cinq jours d'exposition (Petterino and Paolo, 2001) et est généralement supérieure à la plus faible dose létale rapportée dans la littérature (Kolf-Clauw et al. 1995).

Cependant, les prédateurs sont susceptibles de consommer des campagnols intoxiqués plus de 4 mois après un traitement.

Ceci pourrait être expliqué en partie par une baisse de sensibilité de ces individus dû à l'apparition d'un phénomène de résistance aux anticoagulants mais aussi par le fait que des campagnols recolonisant des terriers traités plusieurs mois après le traitement sont susceptibles d'avoir accès aux appâts et de s'intoxiquer.

## **B. Variation temporelle de l'intoxication d'une population de Campagnols terrestres – cas de la recolonisation de terriers traités**

### **1. Introduction**

Les résultats obtenus sur la persistance de la bromadiolone dans les appâts (Sage et al., 2007) (Paragraphe II.A) ont montré sa grande variabilité dans l'environnement. La mise en réserve par les campagnols induit une persistance accrue de la molécule avec une demi vie dans les appâts allant de 27 à 45 jours suivant la saison, et peut avoir une incidence notamment en cas de recolonisation des parcelles traitées par des campagnols avoisinants. Dans les populations de campagnols intoxiqués (Paragraphe III.A), certains individus présentent des taux très élevés de bromadiolone dans leurs tissus plus de 4 mois après un traitement induisant une exposition prolongée de la faune non cible et donc un risque d'empoisonnement secondaire persistant. La présence de résidus dans ces individus nous a conduit à formuler deux hypothèses : (1) ces individus ont été exposés dès les premiers jours à des doses non létales de bromadiolone, leur forte concentration interne pouvant s'expliquer par la persistance importante de cette molécule dans les tissus des rongeurs (demi-vie durant la deuxième phase d'élimination de la molécule de 318 jours dans le foie de rat (Lipha, 1991 ; USEPA, 1998)) ; (2) l'exposition de ces campagnols à la bromadiolone est récente. Elle pourrait être due à la consommation d'appâts empoisonnés provenant de réserves constituées par les rongeurs au cours des premières semaines suivant le traitement. Cependant, aucune étude n'a jamais été réalisée à ce sujet.

Afin de vérifier la validité de cette seconde hypothèse, nous avons cherché à connaître la durée pendant laquelle un campagnol recolonisant un terrier traité pouvait s'intoxiquer et donc présenter des résidus de bromadiolone dans ses tissus potentiellement disponibles pour les prédateurs. Pour ce faire, nous avons réalisé une expérience de recolonisations contrôlées de terriers à différents temps, entre un mois et demi et six mois après un traitement.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1 Site d'étude**

Cette étude a été réalisée sur la commune de Haute-pierre le Chatelet (25) durant l'automne/hiver 2005-2006. Quatre-vingt-dix terriers de Campagnol terrestre ont été sélectionnés sur deux parcelles expérimentales proches (X 0901.264, Y 2235.262 et X 0901.541, Y 2234.340 projection Lambert II étendu / NTF). Dans chacun de ces terriers, 150 grammes d'appâts blé à 50 mg kg<sup>-1</sup> de bromadiolone (ref. 9800527, Liphatech-merck, France) ont été distribués le 1<sup>er</sup> novembre 2005 à l'aide d'une charrue sous-soleuse à une profondeur de 15 cm, dans une galerie artificielle rectiligne de 15 m dans le sens de la plus grande longueur du terrier. Ce traitement a été réalisé conformément au mode d'enfouissement utilisé par les agriculteurs et recommandé par les services administratifs lors de traitements dis « au terrier » (FREDON Franche-Comté et al., 2006). Afin de permettre la mise en réserve des appâts par les campagnols occupant ces terriers, aucun piégeage n'a été réalisé pendant le 1<sup>er</sup> mois et demi suivant le traitement.

### **2.2 Réintroduction de campagnols non intoxiqués dans les terriers traités**

Afin de simuler une recolonisation par des individus venant d'une parcelle voisine non traitée, 3 campagnes de réintroduction ont été réalisées au cours de cette étude, un mois et demi, trois mois, puis 6 mois après le traitement. Avant chacune de ces campagnes, un piégeage des éventuels individus ayant survécu au traitement ou ayant recolonisé le terrier naturellement a été réalisé sur 22 des terriers du site d'étude. Ce piégeage a été réalisé pendant 3 jours consécutifs, à l'aide de pièges létaux « Topcat<sup>®</sup> » (topcat GmgH, Wintersingen, Switzerland) de manière à s'assurer que chacun des terriers considérés était vide et à empêcher une compétition territoriale (Airoidi et al., 1976) avec les individus réintroduits par nos soins. Chaque individu capturé a été stocké à -20°C et à l'abri de la lumière (Morin, 1988 ; Wright, 2002) jusqu'à la préparation des tissus pour le dosage de la bromadiolone. Dans un même temps et pour chaque campagne, un piégeage d'individus sains, capturés vivants à l'aide de pièges « sherman<sup>®</sup> », a été réalisé à une trentaine de km du site d'étude, sur la commune de By (25) dans une zone qui n'a jamais été traitée auparavant à la bromadiolone (X 0869.606, Y 2230.331) (Com pers FREDON et Agriculteurs). Ces individus sains ont été marqués par amputation d'une phalange du pouce

gauche. Onze campagnols ont pu être ainsi capturés puis réintroduits dans onze des terriers de la parcelle d'étude lors de la première campagne, 22 lors de la seconde puis 15 lors de la troisième. Lors de la première campagne de réintroduction, deux campagnols supplémentaires ont été capturés sur la parcelle de By, aucun de leurs tissus n'a montré de résidus détectables.

#### 2.3 Capture des individus réintroduits

Afin de capturer les individus réintroduits lorsqu'ils présentent potentiellement un maximum de résidus de bromadiolone dans leurs tissus et avant leur mort, nous avons considéré les résultats des différentes études précédentes. D'après Sage et al. (2008) (Paragraphe III.A), les résidus de bromadiolone sont maximum dans les tissus des Campagnols terrestres entre 3,3 et 5,6 jours après le traitement lorsque les données sont modélisées avec comme hypothèse une consommation des appâts mis en réserve (taux constant de dégradation de la bromadiolone  $K_0_{storages}$ ). Dans cette même étude, la densité de population de Campagnols terrestres a commencé à diminuer après le 6<sup>ème</sup> jour, coïncidant ainsi avec le taux maximum de mortalité observé par Grolleau et al. (1989) entre cinq et dix jours après la première ingestion de bromadiolone. Nous pouvons donc supposer qu'un piégeage le 5<sup>ème</sup> jour (J5), avant apparition de mortalité et lorsque les concentrations dans les tissus sont maximum, serait idéal. Or, dans notre première étude (Sage et al., 2007), nous avons montré que la concentration en bromadiolone diminuait progressivement dans les appâts enterrés dans des réserves artificielles (demi-vie en automne de 42,7 jours). Nous ne disposons pas de données concernant les concentrations dans les appâts 3 mois et 6 mois après le traitement. Par contre, nous savons que les campagnols réintroduits risquent d'être exposés à des appâts présentant des concentrations divisées par 2,1 un mois et demi après le traitement par rapport à la concentration initiale lors du traitement. Du fait de cette diminution de concentration des appâts, nous pouvons supposer qu'ils ingèreront une dose létale moins rapidement mais nous ne pouvons certifier que les campagnols réintroduits auront un accès aussi rapide aux appâts que les campagnols présents sur une parcelle lors du traitement. Nous avons donc choisi de débiter le piégeage de chacun des individus 7 jours après leur réintroduction. Le piégeage a été réalisé dans un premier temps à l'aide de pièges « Topcat<sup>®</sup> » relevés après 3, 6, 12 puis 24 heures. Si après 24 heures, le campagnol marqué n'avait pas été capturé, des pièges « pince » ont été mis en place pendant 48 heures et relevés toutes les 3, 6 puis 12 heures. Si à nouveau le campagnol marqué n'avait pas été capturé, et en l'absence de signes d'activité (pièges déclenchés ou tumulis frais), le piégeage a été arrêté et les galeries de surface du terrier ont été ouvertes pour retrouver un



éventuel cadavre. Chaque campagnol capturé ou retrouvé mort a été individualisé et stocké dans les mêmes conditions que pour les individus capturés avant réintroduction.

#### **2.4 Préparation des échantillons et dosage de la bromadiolone**

Chaque individu a été décongelé à température ambiante puis pesé. Le foie, le tube digestif et le reste du corps (appelé carcasse par la suite) ont été séparés et préparés pour l'analyse de la bromadiolone suivant la méthode décrite par Sage et al. (2008). Le foie a été laissé entier, le tube digestif et la carcasse ont chacun été homogénéisés séparément. Les échantillons (0,2 g de foie, 1,0 g de carcasse et 1,0 g de tube digestif) ont été extraits à l'acétone avec comme étalon interne du difénacoum (lot 0395167, Lipha-Tech, France). Les concentrations en bromadiolone ont été mesurées par HPLC en se basant sur la méthode analytique de Sage et al. (2008). L'utilisation d'une chaîne HPLC plus récente (LaChrome Elite VWR International, Darmstadt, Germany) nous a permis d'optimiser les limites de détection par rapport à cette précédente étude. Elles ont ainsi été divisées par deux et sont maintenant de 0,1 mg kg<sup>-1</sup> dans le foie, 0,02 mg kg<sup>-1</sup> dans la carcasse et 0,05 mg kg<sup>-1</sup> dans le tube digestif. La concentration totale dans chacun des campagnols a été calculée à partir des concentrations mesurées dans les différents tissus. Nous distinguerons alors les individus dits « positifs » dans lesquels des résidus de bromadiolone ont été détectés dans au moins un tissu, des individus dits « négatifs » dans lesquels aucun résidu de bromadiolone n'a pu être détecté dans les tissus analysés.

#### **2.5 Analyses statistiques**

La normalité de la distribution des données a été testée en utilisant le test de kolmogorov-Smirnov. Lorsque la normalité n'a pu être acceptée, ou lorsque les données n'ont pu être transformées, les comparaisons ont été basées sur des statistiques non paramétriques (Siegel et Castellan, 1988 ; Sokal et Rohlf, 1995) avec les tests de Kruskal-Wallis ou de Wilcoxon, Mann et Whitney. Les comparaisons pour une même modalité entre les trois campagnes de réintroduction ont été basées selon Graffen et Hails (2002) sur un test du Khi<sup>2</sup> ou un test exact de Fisher. Chacune des proportions calculées a été exprimée en pourcentage (e.g., nombre de terriers dans lesquels au moins un campagnol a été capturé par rapport au nombre total de terriers. L'incertitude sur ces pourcentages dépend du nombre d'individus prélevés et varie donc d'un échantillon à l'autre. Aussi un intervalle de confiance (IC95%) dans lequel la valeur estimée a 95% de chance de se trouver (risque  $\alpha=0,05$ ) a été calculé.

### 3. Résultats

#### 3.1 Piégeage des terriers avant chaque campagne de réintroduction

Le nombre de terriers piégés avant chaque campagne de réintroduction dans lequel au moins un Campagnol terrestre a été capturé augmente au cours du temps ( $\text{Khi}^2$ ,  $p=0,019$ ). Il passe de 0/22 (0% ; IC95% 0,0-18,5) lors de la 1<sup>ère</sup> campagne à 4/22 (18,2% ; IC95% 6,0-41,0) pour la 2<sup>nde</sup> puis 5/22 (22,7% ; IC95% 8,7-45,8) lors de la 3<sup>ème</sup> et certains terriers ont été recolonisés par plusieurs individus. Parallèlement, le nombre de Campagnols terrestres capturés dans les terriers traités avant chaque campagne de réintroduction augmente au cours du temps ( $\text{Khi}^2$ ,  $p=0,019$  ; Table 9). Si aucun individu n'a été capturé avant la 1<sup>ère</sup> campagne de réintroduction, le nombre de Campagnols terrestres présentant des résidus de bromadiolone dans au moins un de leur tissus diminue entre la 2<sup>nde</sup> et la 3<sup>ème</sup> campagne de réintroduction (Fisher,  $p=0,028$ ). Cependant, nous pouvons souligner que deux campagnols sur les 7 capturés 6 mois après le traitement sont positifs. Le Campagnol des champs capturé avant la 2<sup>nde</sup> campagne présentait lui aussi des résidus de bromadiolone, par contre, aucun résidu n'a été détecté dans les taupes capturées. Les concentrations mesurées dans chacun des tissus des individus « positifs » sont présentées dans la Figure 23. En ne considérant que les individus positifs, aucune différence n'a été mise en évidence entre les concentrations mesurées dans les tissus de ceux piégés avant la 2<sup>nde</sup> campagne de réintroduction et celles mesurées avant la 3<sup>ème</sup> campagne (Mann et Whitney,  $p=0,29$  ; 0,13 et 0,80 pour le foie, la carcasse et le tube digestif, respectivement). Par contre, du fait d'une diminution du nombre de Campagnols terrestres exposés au cours du temps, les concentrations moyennes de chacun des tissus mesurés avant les campagnes de réintroduction en intégrant la totalité des individus piégés (positifs comme négatifs) ont été divisées par 17,1 ; 7,8 et 11,7 entre la 2<sup>nde</sup> et la 3<sup>ème</sup> campagne de réintroduction dans les foies, carcasses et tubes digestifs, respectivement (Mann et Whitney,  $p=0,002$  ; 0,036 et 0,022).

III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

Nombre d'individus		Nombre d'individus									
Réintroduction (mois après le traitement)	Capturés avant réintroduction	Réintroduits		Capturés vivants ou retrouvés après traitement			Morts en fonction du jour de piégeage			Positifs capturés (% par rapport au nombre d'individus capturés)	
		(animaux qualifiés de recolonisants naturels)	(animaux qualifiés de réintroduits artificiellement)	J7	J8	J9	J10	Total	(morts dans galeries)	(% par rapport au nombre d'individus réintroduits)	Avant réintroduction (animaux qualifiés de recolonisants naturels)
1 <sup>ère</sup> (1,5)	0	11	4	1	0	0	8 (72,7%) (IC95% 39,3-92,7)	0/0	6/8 (75,0%) (IC95% 35,6-95,5)		
2 <sup>ème</sup> (3)	5 AT 1 MA	22	3	6	3	0	12 (54,5%) (IC95% 32,7-74,9)	5/5 AT (100%) (IC95% 0,46-100,0) 1/1 MA (100%) (IC95% 5,4-100,0)	7/12 (58,3%) (IC95% 28,6-83,5)		
3 <sup>ème</sup> (6)	7 AT 5 TE	15	4	0	0	1	5 (33,3%) (IC95% 13,0-61,3)	2/7 AT (28,6%) (IC95% 5,1-69,7) 0/5 TE (0%) (IC95% 0,0-53,7)	0/5 (0%) (IC95% 0,0-53,7)		

Table 9. Tableau récapitulatif des captures de Campagnols terrestres (AT), Campagnols de champs (MA) et Taupes (TE) avant les trois campagnes de réintroduction et des Campagnols terrestres réintroduits à chacune des campagnes. Chacune des proportions calculées a été exprimée en pourcentage et son intervalle de confiance IC95% est précisé.

#### 3.2 Capture des individus après leur réintroduction dans les terriers traités

Aucune diminution significative n'a pu être mise en évidence au cours du temps entre les taux de recapture des individus réintroduits dans les terriers des 1<sup>ère</sup>, 2<sup>nde</sup> et 3<sup>ème</sup> campagnes de réintroduction ( $\chi^2$ ,  $p=0,132$ ) (Table 9). Le pourcentage d'individus positifs recapturés est constant entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>nde</sup> réintroduction (test de Fisher,  $p=0,642$ ) mais diminue significativement entre la 2<sup>nde</sup> et la 3<sup>ème</sup> (test de Fisher,  $p=0,044$ ) et entre la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> réintroduction (test de Fisher,  $p=0,021$ ). Aucun résidu n'a alors été détecté dans les tissus des cinq campagnols réintroduits capturés après la 3<sup>ème</sup> campagne. Nous montrons donc ici que des Campagnols terrestres recolonisant une parcelle pendant au moins les trois premiers mois qui suivent un traitement, peuvent rester une dizaine de jours dans leur nouveau terrier et ainsi accéder à des appâts empoisonnés et être exposés à la bromadiolone. Les individus réintroduits présentent alors des concentrations dans le foie de l'ordre de quelques  $\text{mg kg}^{-1}$  entre 7 et 10 jours suivant la recolonisation, à l'exception de 2 individus dont les concentrations hépatiques sont 10,0 et 24,5  $\text{mg kg}^{-1}$  un mois et demi et 3 mois après le traitement, respectivement. Les concentrations mesurées dans chacun des tissus des individus « positifs » sont présentées dans la Figure 23. Aucune différence n'a pu être montrée entre les concentrations mesurées dans le foie, la carcasse et le tube digestif des individus « positifs » réintroduits lors de la 1<sup>ère</sup> campagne et celles mesurées lors de la 2<sup>nde</sup> campagne (Mann et Whitney,  $p=0,63$  ; 0,91 et 0,59, respectivement). De même, si l'on considère la totalité des individus recapturés (positifs comme négatifs), les concentrations observées dans chacun des tissus n'est pas significativement différente entre les individus de la 1<sup>ère</sup> réintroduction et celles mesurées dans les individus de la 2<sup>nde</sup> réintroduction (Mann et Whitney,  $p=0,37$  ; 0,13 et 0,22 pour le foie, la carcasse et le tube digestif respectivement).

La quantité moyenne contenue dans chacun des individus réintroduits qui ont été recapturés est de  $13,1 \pm 25,5 \mu\text{g.campagnol}^{-1}$ . Si l'on ne considère que les individus positifs, cette quantité moyenne est multipliée par deux avec  $26,3 \pm 30,9 \mu\text{g.campagnol}^{-1}$  dont un des individus présentant 120 $\mu\text{g}$  de bromadiolone.

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

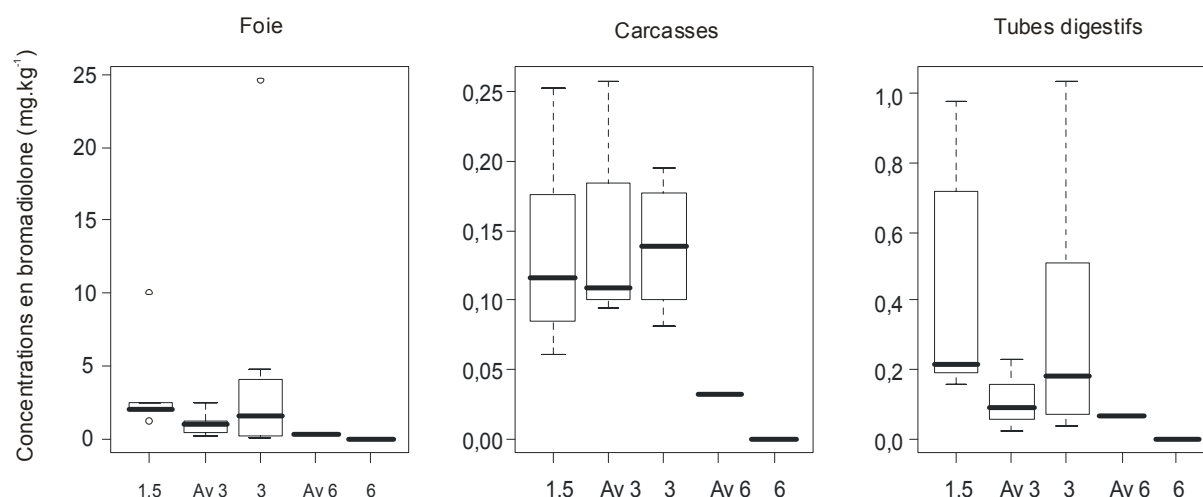


Figure 23. Concentration en bromadiolone (médiane et quartiles) dans le foie, la carcasse et le tube digestif des campagnols capturés avant la réintroduction (Av) ou réintroduits 1,5 ; 3 et 6 mois après le traitement.

#### 3.3 Distribution de la bromadiolone dans les tissus

Les pourcentages de bromadiolone contenue dans chacun des tissus par rapport à la quantité totale contenue dans tout le corps des individus positifs piégés lors de cette expérimentation sont présentés dans la Figure 24. Dans les individus piégés avant réintroduction, le tube digestif est l'organe qui contient le moins de bromadiolone (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ) avec  $57,2 \pm 22,8$  ;  $29,6 \pm 24,8$  et  $13,2 \pm 16,2$  % de la bromadiolone totale dans le foie, la carcasse et le tube digestif, respectivement. Chez les individus réintroduits, le même phénomène est constaté (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ) puisqu'on trouve  $53,1 \pm 19,8$  ;  $19,5 \pm 15,07$  et  $27,4 \pm 21,2$  % de la bromadiolone totale dans le foie, la carcasse et le tube digestif, respectivement. Aucune différence n'a pu être montrée entre la concentration en bromadiolone mesurée dans la totalité du corps des campagnols et celle mesurée dans le corps sans le tube digestif, et cela quelle que soit la modalité retenue (Wilcoxon,  $p = 0,45$  ;  $p = 0,46$  et  $p = 0,74$  pour les individus piégés avant réintroduction, les individus réintroduits et l'ensemble des individus, respectivement). Aucune différence n'a pu être montrée entre le rapport bromadiolone contenue dans les foies / bromadiolone contenue dans tout le corps des individus réintroduits et celui des individus piégés avant réintroduction (Mann et Whitney,  $p = 1,00$ ). Il en a été de même pour les carcasses (Mann et Whitney,  $p = 0,27$ ). Par contre les tubes digestifs des individus réintroduits contiennent proportionnellement plus de bromadiolone que ceux des individus piégés avant réintroduction (Mann et Whitney,  $p = 0,04$ ).

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

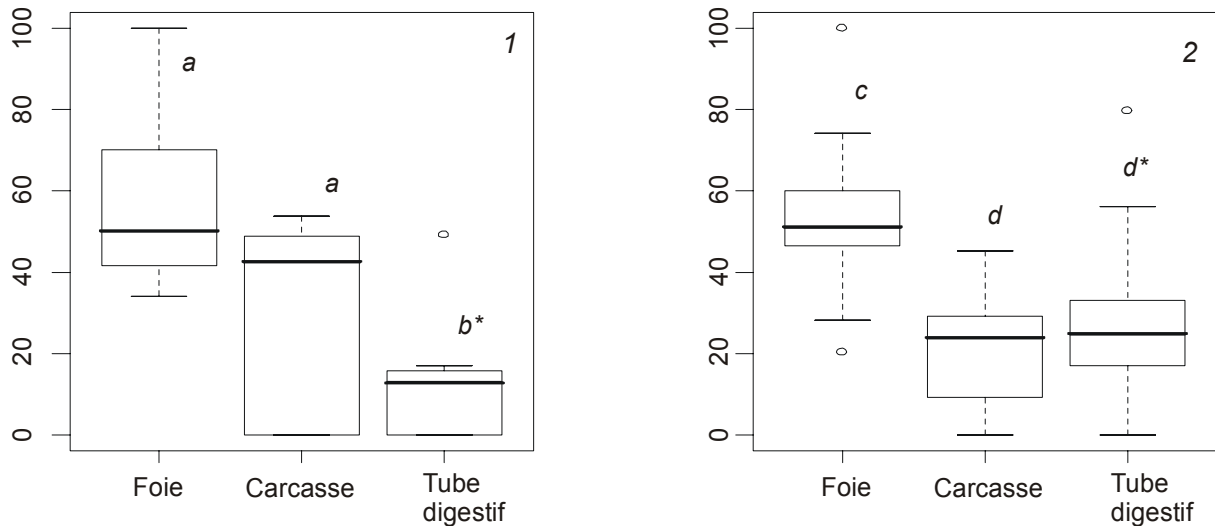


Figure 24. Pourcentage de bromadiolone (médiane et quartiles) contenue dans chacun des tissus par rapport à la quantité totale contenue dans tout le corps des individus positifs piégés avant réintroduction (1), et de ceux réintroduits (2). Une lettre identique entre tissus d'une même modalité indique une absence de différence entre ces tissus (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Un astérisque indique une différence pour un même tissu entre les modalités 1 & 2 (Mann et Whitney,  $p < 0,05$ ).

## 4. Discussion

### 4.1 Individus capturés avant les campagnes de réintroduction

L'absence de campagnols dans les terriers un mois et demi après le traitement, avant de procéder à la première réintroduction d'individus sains, laisse supposer que l'efficacité du traitement a été optimale et qu'aucun individu provenant des parcelles voisines n'est encore venu recoloniser « naturellement » les terriers traités à cette date. Il existe donc de fortes présomptions pour que les individus piégés juste avant la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> réintroduction ne soient pas des campagnols ayant survécu au traitement mais soient des « recolonisants naturels » et que ce taux de recolonisation augmente alors progressivement au cours de l'expérience. Malgré une compétition territoriale présumée entre ces deux espèces (Fritschy et Meylan, 1980 ; Giraudoux et al., 1995 ; Meylan et Höhn, 1991), notre expérience confirme que les taupes et les campagnols peuvent utiliser les mêmes galeries (Delattre et al., 2006) puisque des terriers de Campagnol terrestre inoccupés ont pu être aussi recolonisés par des taupes et des individus des deux espèces ont pu être capturés dans un même terrier à quelques heures d'intervalle. Malgré cette tolérance territoriale entre les deux espèces et la fréquentation des mêmes galeries, aucun transfert de bromadiolone n'a été constaté chez la taupe.

Le faible échantillon nous incite à rester prudents quant à l'absence de différence observable entre les concentrations mesurées chez les campagnols positifs capturés avant

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

---

la 2<sup>nde</sup> réintroduction (n=6) et ceux capturés avant la 3<sup>ème</sup> réintroduction (n=2). Par contre, le fait que le nombre d'individus ayant eu accès aux appâts diminue au cours du temps induit des concentrations moyennes mesurées dans les tissus des populations de campagnols présents dans les terriers avant chaque réintroduction qui diminuent au cours du temps. Si dans le paragraphe III.A (Sage et al., 2008), nous avons montré que des campagnols intoxiqués pouvaient être présents sur une parcelle au moins 4 mois et demi (135 jours) après un traitement, notre nouvelle étude montre que ce délai peut être beaucoup plus long puisque 2 campagnols parmi les cinq capturés avant la 3<sup>ème</sup> réintroduction, 6 mois après le traitement, ont présenté des résidus quantifiables de bromadiolone dans leurs tissus.

#### 4.2 Individus réintroduits dans les terriers

L'hypothèse que des campagnols recolonisant des terriers peuvent avoir accès à des appâts empoisonnés et être ainsi exposés à la bromadiolone plusieurs mois après un traitement est ici démontrée. Sept individus sur 12 recapturés trois mois après le traitement ont pu avoir accès à des appâts, par contre, aucun des individus recapturés n'a eu accès aux appâts six mois après le traitement. Malheureusement, la présence d'une hauteur de neige trop importante sur la zone d'étude ne nous a pas permis de réaliser une réintroduction contrôlée entre 3 et 6 mois initialement prévue et nous ne pouvons conclure sur la possible exposition de campagnols recolonisant la parcelle pendant cette période. Dans la plupart des cas, les concentrations internes mesurées dans les différents tissus analysés des individus positifs restent relativement faibles. Par rapport aux concentrations mesurées dans les Campagnols terrestres piégés entre 7 et 10 jours après le traitement (Sage et al., 2008), elles sont en moyenne 9,4 ; 2,8 et 4,9 fois plus faibles dans le foie, la carcasse et le tube digestifs des campagnols réintroduits lors de la première campagne et 6,3 ; 7,0 et 6,0 fois plus faibles lors la seconde réintroduction. Cependant la présence de deux individus avec des concentrations hépatiques relativement proches de celle de  $31,2 \pm 9,9 \text{ mg kg}^{-1}$  observée entre le 7<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jours suivant un traitement par Sage et al. (2008) montrent que les campagnols recolonisant un terrier 3 mois après ont accès à des quantités importantes de bromadiolone. Les concentrations en bromadiolone dans les individus ayant eu accès aux appâts lors de la 1<sup>ère</sup> réintroduction et ceux ayant eu accès aux appâts lors de la 2<sup>nde</sup> réintroduction sont relativement proches, ce qui suggère qu'ils ont ingéré des quantités de bromadiolone similaires au cours de ces deux périodes. Ainsi, seule la disponibilité des appâts semble décroître au cours du temps, notamment entre la 2<sup>nde</sup> et la 3<sup>ème</sup> réintroduction, ce qui induit un nombre de campagnols exposés à la bromadiolone de plus en plus faible.

### 4.3 Distribution de la bromadiolone entre tissus analysés

Comme démontré dans les études précédentes (Sage et al., 2008 ; USEPA, 1998), le foie accumule le plus de bromadiolone et cela quelle que soit la date de recolonisation du terrier. La proportion de bromadiolone retenue dans le foie évolue peu entre les individus capturés avant et après réintroduction. Cette proportion est très proche de celle mesurée par Sage et al. (2008) dans le foie des individus capturés entre 7 et 10 jours après le traitement, i.e.  $58,4 \pm 14,9\%$ . De plus, aucune différence n'a été mise en évidence entre la valeur rapportée par Sage et al. (2008) et nos présents résultats concernant les individus capturés avant les campagnes de réintroduction et ceux réintroduits (Mann et Withney,  $p=0,6$  et  $p=0,4$  respectivement). Par contre, le fait que le tube digestif des individus piégés avant les campagnes de réintroduction contienne proportionnellement moins de bromadiolone que celui des individus réintroduits, nous laisse supposer que les campagnols capturés dans les terriers avant les campagnes de réintroduction ont eu un accès aux appâts moins récent que ceux capturés entre 7 et 10 jours après leur réintroduction.

### 4.4 Taux de recapture

Malgré nos efforts et l'utilisation de 2 types de pièges différents afin de s'affranchir d'une efficacité de capture dépendant du piège utilisé décrite notamment par Lebreton et al. (1992) et Pradel (1993), certains individus réintroduits dans les terriers n'ont pas pu être recapturés. La recapture d'individus marqués dépendant à la fois de leur survie et de leur émigration (Julliard et al., 1995), l'absence d'indice d'activité pendant 4 jours de piégeage consécutifs nous permet de proposer trois hypothèses : (1) Les campagnols réintroduits ont pu quitter le terrier. La capture de deux campagnols marqués dans un même terrier après la 2<sup>nde</sup> campagne de réintroduction confirme cette première hypothèse de mobilité des campagnols réintroduits. (2) Ils ont aussi pu se faire capturer par un prédateur, ou encore (3) mourir dans les galeries plus profondes que nous n'avons pas pu atteindre lors de l'exploration des terriers au 10<sup>ème</sup> jour (J10). La découverte du cadavre d'un campagnol marqué, mais ne présentant aucun résidu de bromadiolone, dans un des terriers après la 3<sup>ème</sup> campagne de réintroduction va dans le sens de cette dernière hypothèse. Certains individus n'ont ainsi peut être pas supporté le stress engendré par leur manipulation. Les faibles effectifs nous demandent de rester prudents, cependant, l'effort de piégeage est resté identique entre les campagnes de réintroduction et l'absence de différence significative entre le taux de recapture entre ces campagnes suggère que l'ensemble de ces trois facteurs de mobilité, prédation et/ou mortalité a peu varié lors de notre expérience.



#### 4.5 Implication pour l'exposition des prédateurs

Malgré les possibles conséquences en termes de risque écologique, la présence de rongeurs intoxiqués sur une parcelle jusqu'à quatre mois et demi après un traitement ne pouvait être réellement expliquée (Sage et al., 2008). La contamination de campagnols suite à une recolonisation de la parcelle plusieurs mois après un traitement était considérée comme possible (Sage et al., 2007, Sage et al., 2008) mais n'avait jamais été démontrée jusqu'à présent. Notre étude apporte des données originales sur la contamination différée de Campagnols terrestres recolonisant des terriers et démontre qu'ils ont accès à des appâts empoisonnés pendant au moins trois mois après le traitement.

Dans la plupart des cas, les résidus disponibles pour les prédateurs dans chacun des tissus de campagnols restent relativement faibles comparés à ceux mesurés quelques jours après un traitement. Du fait que le nombre de campagnols ayant accès à des appâts empoisonnés diminue progressivement, la quantité de résidus qu'un prédateur est susceptible d'ingérer en se nourrissant de campagnols sur une parcelle traitée diminue elle aussi. Elle est ainsi divisée en moyenne par 8,8 puis par 12,2 s'il se nourrit de campagnols ayant recolonisé les terriers 1,5 et 3 mois après le traitement par rapport aux 7 à 10 premiers jours qui suivent le traitement (Sage et al., 2008). Cependant, cette diminution théorique de résidus disponibles pour les prédateurs n'est pas à prendre en compte seule. En effet, du fait de mouvements de fuite réduits et d'un taux de sortie en surface plus élevé, la probabilité de capture d'un campagnol intoxiqué est supérieure à celle d'un campagnol sain (Cox et Smith, 1992 ; Saucy et al., 2001).

A la suite d'une recolonisation de parcelle 1,5 mois et 3 mois après le traitement, les prédateurs peuvent aussi être exposés à des campagnols présentant des résidus proches de ceux observés entre 7 et 10 jours après un traitement. De plus, la présence de résidus dans 2 des 7 campagnols capturés juste avant la 3<sup>ème</sup> campagne nous montre que les prédateurs sont susceptibles d'ingérer de la bromadiolone plus de 6 mois après le traitement. Contrairement à ce qui avait été démontré précédemment (Pargraphe III.A, Giraudoux et al., 2006 ; Sage et al., 2008), le rejet du tube digestif par certaines espèces de prédateurs (Artois, 1989 ; Delattre, 1987) ne modifie pas ici la concentration en bromadiolone des proies qu'ils sont susceptibles d'ingérer. Par contre, le fait que ces prédateurs se nourrissent en premier du foie qui contient entre 53 et 57% de la bromadiolone totale risque d'augmenter la quantité de résidus ingérés.

Ainsi, nos résultats montrent que si le risque d'empoisonnement pour la faune prédatrice reste maximal dans les 3 semaines qui suivent le traitement, il persiste pendant plusieurs mois en cas de recolonisation des terriers par des campagnols des parcelles voisines. A ce propos, nous devons rappeler que les anticoagulants sont plus toxiques

### III. Axe 2 : Cinétique d'intoxication des populations de rongeurs après un traitement

lorsqu'ils sont ingérés pendant plusieurs jours consécutifs (USEPA, 1998 ; Erickson et Urban, 2002 ; Kolf-Clauw et al., 1995). La persistance de la molécule jusqu'à six mois après le traitement dans une population de campagnols et la contamination d'individus recolonisant les terriers traités peut induire une accumulation des résidus chez les prédateurs à la suite d'expositions répétées. Cette exposition sub-létale peut entraîner des anomalies de la coagulation et induire des hémorragies (Eason et al., 1996). Par exemple, la dose répétée aussi faible que  $20 \mu\text{g kg jours}^{-1}$  induisant chez le chien une mort après 64 à 85 jours de traitement (Kemikalieinspektionen, 2006) est très proche de la quantité de bromadiolone moyenne ( $26,3 \pm 30,9 \mu\text{g.campagnol}^{-1}$ ) mesurée dans chacun des individus positif capturé 7 jours après leur réintroduction dans un terrier traité. La prise en compte de la mise en réserve des appâts par les campagnols et du comportement de recolonisation des parcelles traitées présente donc un très grand intérêt pour l'évaluation du risque d'intoxication de la faune non cible prenant en compte la dimension temporelle.

## 5. En bref

Des campagnols recolonisant des terriers traités peuvent avoir accès à des appâts et s'intoxiquer pendant au moins trois mois suivant un traitement.

Aucun des campagnols réintroduits 6 mois après le traitement et qui a pu être recapturé n'a présenté de résidus de bromadiolone

La quantité qu'un prédateur est susceptible d'ingérer est diminuée par 8,8 puis 12,2 s'il se nourrit d'un campagnol ayant recolonisé la parcelle 1,5 et 3 mois après le traitement respectivement, par rapport à la quantité ingérée s'il chasse sur une parcelle dans les 3 semaines qui suivent le traitement.

Deux des sept campagnols déjà présent sur la parcelle avant la campagne de réintroduction 6 mois après le traitement présentent des résidus de bromadiolone détectable.

Un prédateur est donc susceptible d'ingérer de la bromadiolone près de 6 mois après un traitement et être ainsi exposé à des doses faibles mais continues.

Le développement d'une méthode de mesure de l'exposition du renard *in situ* pourrait permettre d'évaluer et de mieux comprendre ces phénomènes de transferts jusqu'aux prédateurs.



## **IV. AXE 3: Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?**



## **A. Detection of bromadiolone residues in fox faeces by an LC/ESI-MS analytical method in relationship with toxicological data and clinical signs after intoxication**

Cette expérimentation a fait l'objet d'un article qui sera prochainement soumis dans la revue *Environmental research*. Les auteurs sont :

Mickaël Sage <sup>a\*</sup>, Isabelle Fourel <sup>b</sup>, Michaël Cœurdassier <sup>a</sup>, Jacques Barrat <sup>c</sup>, Philippe Berny <sup>b</sup>, Patrick Giraudoux <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chrono-Environment, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, University of Franche-Comte 25030 Besançon Cedex, France.

<sup>b</sup> UMR 1233 ENVL-INRA Mycotoxines et Toxicologie comparée des xénobiotiques - Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, BP83, 69280 Marcy l'Étoile, France.

<sup>c</sup> Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments - Unité épidémiosurveillance des maladies de la faune sauvage, Domaine Piéxécourt, BP 9, 54220 Malzeville, France

**Key-words:** Second Generation Anticoagulant Rodenticide (SGAR), Secondary poisoning hazard, Exposure monitoring, Faeces, liver and blood plasma bromadiolone residues, blood-clotting time.

---

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)381 665 714; fax: +33 (0)381 665 797

*E-mail address:* [mickael.sage@univ-fcomte.fr](mailto:mickael.sage@univ-fcomte.fr) (M. Sage).

## 1. Summary

In many countries, the fox (*Vulpes vulpes*), predator of small mammals, is particularly affected by anticoagulant rodenticides such as bromadiolone due to secondary poisoning. Nevertheless, to date, no method of exposure monitoring is applicable in the field over large areas, and no toxicological data are available concerning sensitivity of foxes to bromadiolone.

The aim of this work was to compare excretion kinetics of bromadiolone in fox faeces with clinical and haemostatic effects after repeated exposure to intoxicated voles. A sensitive method for the quantification of bromadiolone excretion in fox faeces and plasma was developed, using liquid chromatography combined with electrospray ionisation mass spectrometry (LC-ESI-MS). The LOD was 0.9 µg/kg and 0.15 µg/L, and the LOQ was 3.0 µg/kg and 0.5 µg/L, in faeces and in plasma, respectively. Four captive foxes were fed for 2 or 5 days with water voles (*Arvicola terrestris Sherman*) spiked with bromadiolone at concentrations close to those measured in the field. Faeces and blood were collected for bromadiolone titration, and blood-clotting tests were performed to monitor fox health. Then, after euthanasia at D28, a complete necropsy was performed, and levels of bromadiolone residues in the liver were determined.

Bromadiolone residues were detected in faeces 15 hours after the first exposure. They increased dramatically during the exposure period and then gradually decreased, but they remained detectable for at least 26 days after the last exposure (end of the experiment). Bromadiolone residues in plasma showed a similar pattern but were no longer detectable 7 to 24 days after the last exposure. Two foxes presented very severe external haemorrhages, requiring the administration of the antidote vitamin-K1. Bromadiolone residues in faeces and their relationships with exposure and other direct-markers that were measured were discussed. Liver residues and the toxicity data of our study will help to interpret data from fox carcasses collected by wildlife disease surveillance networks.

These findings provide a basis for programs aiming to monitor the exposure of wild fox populations to bromadiolone using non-invasive methods based on standard sampling and analysis of residues in faeces.

## 2. Introduction

Second Generation Anticoagulant Rodenticides (SGARs) are currently used for controlling small mammalian pests. Evidence of their negative impact on non-target fauna has been reported worldwide (e.g., England: McDonald et al., 1998; Shore et al., 2003; France: Fournier-Chambrillon et al., 2004; Lambert et al., 2007; USA: Stone et al., 2003; New Zealand: Eason et al., 2002). The red fox (*Vulpes vulpes*) is the most widespread fox species, found in both rural and urban habitats throughout the world (Mitchell-Jones et al. 1999). Depending on food availability, its diet can be mainly or even exclusively composed of live or dead rodents (Weber and Aubry, 1993). Thus, it may be particularly exposed to secondary poisoning when rodenticides are used (e.g., Barnett et al., 2006; Berny, 2007; Berny et al., 1997). In some countries, particularly in Europe, the SGAR bromadiolone is intensively used in the field. It is the only rodenticide authorised in France for controlling the population outbreaks of the water vole *Arvicola terrestris Sherman* (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2002). Vole control operations using bromadiolone are undertaken over large areas (e.g., hundreds of km<sup>2</sup>), and dozens to hundreds of secondary poisonings of red foxes have been reported each year (Berny et al., 1997; Kupper et al., 2006; Raoul et al., 2003; SAGIR, 1990-2007).

Ecotoxicological risk is a function of both exposure and toxicity. To date, no adapted methods are available to measure fox population exposure in the field over large areas. Non-invasive direct-markers (mainly used with domestic species) such as blood-clotting time or anticoagulant analysis in plasma (Boermans et al., 1991; Mount and Feldman, 2002) require catching animals. This may be quite difficult with wild carnivores or raptors. Therefore, for practical and ethical reasons, tissues analysis on carcasses collected from wildlife disease surveillance networks is the only method available to determine the level of exposure to SGARs of foxes and other predators (e.g., Alterio, 1996; Alterio et al., 1997; Barnett et al., 2006; Berny et al., 1997; Brown et al., 1998; Eason et al., 1999; Eason and Spurr, 1995; Fournier-Chambrillon et al., 2004; McDonald et al., 1998; Murphy et al., 1998; Shore et al., 2003; Walker et al., 2008). However, searching for carcasses typically has a low success rate (Howald et al., 1999). Therefore, the impact of poisoning on the rodent predator population may be underestimated and records of poisoning are only obtained after mortality has occurred. Bromadiolone level available for secondary poisoning has been compared from simulations using rodent body residues measured in the field (Sage et al. accepted). However, ecological information that may have important impacts on bromadiolone transfer in food webs (such as rodent-predator interactions, as well as behaviour and feeding habits of predators) are difficult to obtain (Brakes and Smith, 2005). This type of information was not



#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

---

taken into account in these simulations. The analysis of residues of SGARs other than bromadiolone in regurgitated Barn owl pellets could be used to monitor their exposure (Eadsforth et al., 1991; Gray et al., 1994; Newton et al., 1994). We hypothesised that similarly, bromadiolone residue analysis in faeces could be used as a non-invasive indirect method of monitoring the exposure of foxes in the field. The study by Lipha (1987) on rats concluded that faeces represented the major route of bromadiolone excretion, with 53.3% of the radiolabelled bromadiolone administrated dose excreted in the first 2 days. However, no information is available concerning anticoagulant excretion via faeces for foxes. The utilisation of radiolabelled molecules is inconceivable in the field over large areas, and current analytical methods using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography (GC) (Erickson and Urban, 2002; Kemikalieinspektionen, 2006; USEPA, 1998) are neither selective nor sensitive enough to detect and quantify bromadiolone in faeces. HPLC coupled with a Mass Spectrometry detector (LC/MS) is a method known to allow quantification at trace levels in complex matrices because of its high specificity and sensitivity (Jin et al., 2007). This method could therefore be used, but no analytical methods have been validated on anticoagulant in faeces.

Although foxes may be at high risk of exposure, to our knowledge, no data are available concerning bromadiolone toxicokinetics and toxicodynamics for this species (AGRITOX INRA, 2004; Erickson and Urban, 2002; Giraudoux et al., 2006; Kupper et al., 2006; USEPA, 1998). To date, their mortality after field control operations targeting water voles remains poorly understood (Giraudoux et al., 2006). As such, it appears indispensable to evaluate the effects of bromadiolone ingestion with non-invasive markers used on domestic animals. Nevertheless, neither blood-clotting time nor bromadiolone plasma kinetics has previously been investigated in foxes feeding on bromadiolone-poisoned rodents. Furthermore, although high sensibility bromadiolone titration is common in human blood (Grobosch et al., 2006; Jin et al., 2007), no analytical method has been validated in foxes. SGARs are known to be quickly assimilated by the body and gradually eliminated in tissues, liver being the accumulation organ (Erickson and Urban, 2002). However, no relationship has been established between concentrations observed in tissues of intoxicated foxes and bromadiolone effects.

The first objective of this study was to develop a new LC/MS method for bromadiolone titration in fox faeces and plasma. Secondly, we determined the excretion kinetics of bromadiolone in faeces of captive foxes fed a repeated dose similar to what they could eat in the field. At the same time, we investigated the toxicological data and the clinical and haemostatic effects on those foxes by monitoring bromadiolone kinetics in plasma, residues in liver and blood-clotting tests (Erickson and Urban, 2002; USEPA, 1998). Finally, we aimed to determine if there is a relationship, usable as a non-invasive indirect marker,

between the bromadiolone kinetic in faeces and fox health, observed with the direct exposure and effects markers.

### 3. Materials and methods

#### 3.1 Fox exposure

Experiments were conducted at the experimental farm of Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, Nancy – France; agreement nb. A54747). The animal used in this study was the silver fox, which belongs to the same species as the 'wild' red fox, (*Vulpes vulpes*). Five foxes of mixed sex, weighing 6.8 to 7.4 kg (mean = 7.0) were individually caged. They were born at the experimental farm of our laboratory, were 6 years old, and had never been exposed to anticoagulants. According to Artois (1989), foxes eat between 0.3 and 0.6kg of food per day, which represents 4 to 8 water voles. Sage et al. (2008) demonstrated that bromadiolone residues in water voles in the field appeared maximal during 20 days after treatment and that mean quantity was  $194 \pm 70.4 \mu\text{g}/\text{voles}$  for this period. To simulate potential field exposure to bromadiolone, multiple low-dose oral administrations were used. Prior to the feeding trial, foxes fasted for one day. For each exposure day, captive foxes were offered (as the only food) 5 water voles trapped in an area that had never been treated with bromadiolone before. Each of the voles was spiked with a quantity of bromadiolone close to what was found in the study of Sage et al. (submitted): 200  $\mu\text{g}$  of bromadiolone/vole (batch 511101, Liphatech, France) dissolved in 1 mL of ethanol (Carlo Erba analytical grade) and injected in five places in the rodent's body (i.e., 1000 $\mu\text{g}$  of bromadiolone per day per fox). Unfortunately, the  $\text{LD}_{50}$  for foxes is unknown (Erickson and Urban, 2002; USEPA, 1998), but the quantity administered in our study was very similar to the lowest lethal dose for dogs reported in literature; i.e., 150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  for 5 days (Kolf-Clauw et al., 1995). This translates to 1050  $\mu\text{g}/\text{day}$  for a 7.0 kg fox. This operation was repeated during two consecutive days of exposure (D0 and D1) for one male (called F2) and during five consecutive days of exposure (from D0 to D4) for two males and one female (called F5.1, F5.2 and F5.3, respectively). As a control, one female fox (called F0) was fed during 5 days with rodents that were not poisoned but were spiked with 1 ml of pure ethanol. After the exposure period, all foxes were fed with non-contaminated water voles until D10; then they were fed on their usual diet (dry food) until D28 (end of the experiment). Water was provided *ad libitum* for every fox).

### 3.2 Sampling

Faeces were collected and immediately stored at -20°C in the dark (Morin, 1988; Wright, 2002) for bromadiolone titration. Collection took place immediately before exposure (D0), 15 hours after the first ingestion (H15), then daily for the first ten days of the experiment and every three or five days (spacing out gradually) over the next 28 days (D1 to D10 and D12, D15, D17, D22 and D28). Blood was collected from the jugular vein into 10 mL vacuum tubes containing 1 mL of trisodium citrate (0.109 M) on the same sampling days as faeces. All blood samples were centrifuged immediately for 15 min at 2,500 g, and plasma was separated. Blood-clotting tests were determined, and the rest of the plasma was stored at -20°C for later bromadiolone titration. All foxes were sacrificed by a T61® intravenous injection (Hoechst Roussel Vet, Brussels, Belgium) after 28 days. A complete necropsy was performed, and the liver was collected for bromadiolone titration.

### 3.3 Bromadiolone titration in faeces and plasma

**Solvents and materials** - All chemicals, reagents, and solvents used were of analytical grade. Methanol was obtained from Carlo Erba (code n°412532), acetone from Riedel de Haën Pestanal (code 34480), dichloromethane from Sigma-Aldrich (34856), hexane (1.04367.1000) and acetonitrile (1.14291.2500) from Merck, and ammonium acetate (MS grade) from Fluka. Ultra-pure water was supplied by a Milli-Q Plus water purification system from Millipore. Bromadiolone (batch 511101) and difenacoum (batch 0395167) as an internal standard (IS) (Lipha-Tech, France) were dissolved in methanol to make individual stock solutions of 100 mg/L. Those were stored at -20°C until they were diluted, as needed, with methanol to prepare spiking solutions at concentrations of 1, 1.5, 5, 10, 25, 50, 100, 175, 250, 500 µg/L for bromadiolone and 500 µg/L for IS.

**HPLC/MS system** - Analytical methods for development and validation were performed on a 1100 Series ESI/LC/MSD ion Trap VL, consisting of an on-line solvent degasser, binary pump, autosampler and column temperature module, with an electrospray ionisation (ESI) source and ion trap analyser, all controlled with the HP Chemstation software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separation was performed using a Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1mm × 100mm, 3.5µm) column and a Zorbax Eclipse XDB-C8 (2.1mm × 12.5mm, 5µm) guard column from Agilent Technologies with a mobile phase of A: 10mM ammonium acetate and B: methanol. The mobile phase gradient elution was 30%A:70%B (v:v) at 0 min, increasing to 80%B from 0 to 5 min, and to 90%B at 6 min, holding at 90%B during 4 min and back at 70% B at 11 min, for a total run time of 18 min. The column temperature was 30°C. The temperature of the autosampler tray was set to 5°C.

The system was operated at a flow rate of 0.250 mL/min. The injection volume was 1  $\mu$ L. The mass spectrometric conditions were optimised by infusing solutions of pure standards diluted in mobile phase. The capillary voltage was 2828V. The source temperature was maintained at 350°C. The settings for nebuliser gas ( $N_2$ ) were 40 psi, and the source gas flow was 8 L/min. The high vacuum in the trap was  $1.1 \cdot 10^{-5}$  mbar. The mass spectrum of bromadiolone showed deprotonated precursor ions ( $[M - H]^-$ ) at  $m/z$  527 and 525 (diastereoisomers). The mass spectrum of the IS showed a precursor ion ( $[M - H]^-$ ) at  $m/z$  443. Identification of bromadiolone was confirmed by the LC retention time compared to a calibration standard and the double  $m/z$  527 and 525. Although the Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) source was also tested, the Electro-Spray Ionisation (ESI) source, operated in the negative ion mode (-ESI), gave higher sensitivity for the bromadiolone, and its IS. MS/MS quantification was tested on spiked samples but did not show better sensitivity compared to MS. This was due to a poor fragmentation rate for bromadiolone.

***Faeces extraction procedure*** - Samples were crushed, still frozen, to obtain a homogeneous mixture and were dried during 48 h at 30°C. Fresh mass (F.M.) and dry mass (D.M.) were measured. In order to compare bromadiolone excretion between each fox in this experiment, as well as between our results and field data, faeces contents were expressed in mg of bromadiolone per kg of dry faeces. From those concentrations, bromadiolone quantity excreted by faeces was calculated. An aliquot of 0.5 g (D.M.) was weighed and placed in a 100 mL tube containing IS (200  $\mu$ L of a 2.5  $\mu$ g/mL solution) and 10 mL of acetone. This was homogenised for 30 s using an Ultra Turrax tissue disperser. Ten mL of acetone was poured into another tube to carefully rinse the disperser for 30 s and was added to the first tube. The tissue disperser was washed with water and soap and rinsed with absolute ethanol between each sample. The homogenate was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Four mL of supernatant was taken and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 50°C. The residue was reconstituted with 2 mL of dichloromethane/hexane (50:50), shaken for 20 s with a Vortex (MS2 Minishaker IKA-WERK, Staufen, Germany) and cleaned up by solid phase extraction as follows: extract was loaded onto a Sep-Pak<sup>®</sup> Silica cartridge Vac 3cc (Part N° WAT020810 Lot N° 044034057C Waters, USA). Each cartridge was rinsed with an additional 1 mL of dichloromethane/hexane (50:50) to fix the two compounds and wash away impurities, and it was then dried, under vacuum for 10 s. The analytes were eluted twice with 1.5 mL of dichloromethane/acetonitrile (50:50), and the cartridge was dried under vacuum for 10 s to obtain a quantitative elution. The eluate was then dried, reconstituted with 200  $\mu$ L of methanol and vortex mixed for 30 s. These solutions were used for LC/MS analyses. If samples were too concentrated and were not within the concentration range of the calibration curve, clean-up by solid phase extraction was repeated

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

---

on another 4 mL of supernatant, and eluate was reconstituted with 1 mL of methanol and vortex mixed for 30 s.

**Plasma extraction procedure** – Samples were thawed at room temperature and shaken for 10 s with a Vortex. For each sample, 1 mL was extracted with liquid-liquid extraction tubes (Toxitude B<sup>®</sup>, Varian inc., Lake Forest, CA, USA), and 200 µL of IS solution (2.5 µg/ml) was added. Extraction was conducted according to the manufacturer-procedure and Berny et al. (2006). The tubes were shaken by gentle inversion for 2 min and centrifuged at 3200rpm for 10 min. The upper layer was removed and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 50°C. The dry residues were reconstituted with 200 µL of methanol. These solutions were used for LC/MS analysis. If the samples were too concentrated and were not within the concentration range of the calibration curve, these solutions were diluted 5-fold in methanol.

**Validation of the analytical procedures for faeces and plasma samples** — Specificity was determined through assessment of four blank faeces samples or four blank plasma samples obtained from foxes before exposure (D0). Solvents were also checked for contamination with substances that could potentially interfere with analyses. Background noise levels associated with the analyses were determined based on the findings from blank faeces or plasma samples; for each analysis, a limit of detection (LOD; three times the noise level) and a limit of quantification (LOQ; ten times the noise level) were determined theoretically. To check the validity of the analyses, spiked samples were prepared and analysed until peaks measured on the chromatogram corresponded to the determined limits. Linearity was determined with ten-point calibration curves on both standard solutions and spiked samples. Preliminary titrations of faeces and plasma, sampled the last day of the exposure period (theoretically the most concentrated) and at the end of the experiment, the last day of the post-exposure period (theoretically the least concentrated), provided the linear range. A linear regression curve was determined from the ratio of the peak area of bromadiolone to the peak area of IS and compared to the ratio of response observed in a calibration standard. Percentages of recovery were determined for six samples spiked at the same concentration (middle of the linear range) to verify that bromadiolone and internal standards were extracted to a similar extent and that extraction conditions were acceptable compared with expected concentrations. Because bromadiolone concentrations were determined by calculation of the ratio of the bromadiolone peak area to the peak area of its IS, results were not corrected for percentage recovery. The repeatability of the extraction procedure and LC/MS analysis was determined with six samples. Coefficients of variation (SD x 100/mean) were determined for bromadiolone and IS. All diluted standard solutions were shown to be stable for 24 hours at room temperature (20° to 25°C), for one week at 5°C

and for at least one month at -20°C. Sample solutions are stable for 24 h at 5°C, and analyses were always conducted within 10 h of sample extraction; meanwhile, they were stored at 5°C. For quality assurance purposes, faeces and plasma samples spiked with bromadiolone, as well as blank samples, were assessed each day of the analysis.

### **3.4 Bromadiolone titration in liver**

Samples were thawed at room temperature. Liver proceeding and bromadiolone concentrations were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) according to the method derived from Hunter (1983a; 1983b) and described by Giraudoux et al. (2006) for rodent liver with difenacoum (as an internal standard) and fluorescence detection.

### **3.5 Blood-clotting test**

Activated Partial Thromboplastin Time (APTT); Kaolin-Activated Partial Thromboplastin Time (kAPTT/KCT) and Prothrombin Time (PT) are the most commonly used screening assays for anticoagulant intoxication (Mount, 1988; Woody et al., 1992). They were assessed immediately after collection of the blood samples on centrifuged plasma by use of an Option 2+ apparatus (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Kit reagents used were STA<sup>®</sup> – PTT A; C.K. Prest<sup>®</sup> and Neoplastine<sup>®</sup> Cl, respectively (Diagnostica Stago, Asnières, France). Clotting-time tests were stated in seconds according to the manufacturer's instructions. As reference values for foxes were lacking (Beklova et al., 2007) and no data were available with those kit reagents, those tests were achieved on ten uncontaminated foxes before the experiment. Each value was determined as the mean of two measurements; if there was a difference higher than 10% between these two values, clotting-time determination was repeated.

### **3.6 Therapeutic protocol**

Based on previous studies on dogs (Mount, 1988), we decided to treat the foxes with vitamin K<sub>1</sub> (Roche, Fontenay-sous-Bois, France) using intravenous injections (5mg/kg) followed by oral administration (2.5 to 5 mg/kg until stability of normal PT). Foxes were treated when PT was greater than 50 s, when foxes had clinical signs such as weakness or anaemia, or when haemorrhages were observed. Under such circumstances, and according to the mode of action of the antidote, blood-clotting time should quickly decrease, but the

kinetic curve of bromadiolone concentration in faeces and plasma should not be affected (Woody et al., 1992). After two days of vitamin K1 administration, therapy was suspended. If no increase in blood-clotting time was observed, therapy was stopped.

### 3.7 Statistics

The normality of blood-clotting test data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Means and median were estimated by bootstrapping (replicates = 1000). The mean and the standard error (SE) were given if the variable proved normally distributed; if not, the median and the 95% empirical confidence interval (CI) were computed from the bootstrap replicate distribution. Due to lack of normality and problematical transformations to Gaussian distribution, comparisons were generally based on nonparametric statistics (Siegel and Castellan, 1988; Sokal and Rohlf, 1997). The Wilcoxon, Mann, and Whitney tests were used to compare two independent samples. Blood clotting time values were considered to be increased if they were 25% greater than the mean pre-exposure values (Johnstone, 1988; Woody et al., 1992). Determination of the absorption kinetics of bromadiolone was not possible in our study due to the dosing regimen, with repeated exposure and sampling not frequent enough during the first hours of the experiment. However, bromadiolone has previously been reported to exhibit a biexponential decay pattern in different tissues (Erickson and Urban, 2002), and its persistence in plasma and faeces was analysed individually for each fox using a one-compartment model with equation (1), derived from Widianarko and Van Straalen (1996):

$$C_t = C_e e^{-k(t-t_e)} \quad (1)$$

where  $C_t$  is the bromadiolone concentration in the tissue (mg/kg or mg/L for faeces and plasma, respectively),  $C_e$  is the maximal concentration observed the day after the last exposure,  $k$  is the concentration decrease rate ( $\text{day}^{-1}$ ),  $t$  is the time since the beginning of the experiment (days) and  $t_e$  is the day after the last exposure ( $\text{day}^{-1}$ ).

Disappearance half-lives ( $DT_{50}$ ) were calculated according to equation (2) (Toutain and Bousquet-Mélou, 2004):

$$DT_{50} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (2)$$

Biologically,  $DT_{50}$  corresponds to the time for the plasma to eliminate or degradate half of the bromadiolone present the day after the last exposure. In regards to faeces, it is the time for each fox to excrete half of the bromadiolone that it excretes the next day after the exposure

period. The model was fitted using non-linear regression. Different variance functions were used to model the variance structure of the within-group errors using covariates (Pineiro and Bates, 2000). Models were compared using the information theoretic approach, as outlined by Burnham and Anderson (2004) and Sakamoto et al. (1996). The differences in the parameter estimates between foxes were judged from the overlap of the 95% confidence intervals. Statistics were performed using R2.4.1 (R Development Core Team, 2004).

## 4. Results and discussion

### 4.1 Validation of the bromadiolone method titration in faeces and plasma

Analyses of bromadiolone in faeces and plasma extracts with the HPLC/ESI/MS assay were specific and linear over the ranges of concentrations tested ( $r^2 > 0.99$  from 2 to 500  $\mu\text{g/L}$  in faeces and from 0.5 to 100  $\mu\text{g/L}$  in plasma). The LOD was 0.9  $\mu\text{g/kg}$  and 0.15  $\mu\text{g/L}$ , and the LOQ was 3.0  $\mu\text{g/kg}$  and 0.5  $\mu\text{g/L}$ , in faeces and in plasma, respectively. Although extraction rate was smaller in faeces than in plasma for bromadiolone ( $63.5 \pm 5.6$  vs  $91.0 \pm 3.9$  %, Wilcoxon, Mann and Whitney;  $p=0.02$ ) and IS ( $65.9 \pm 5.8$  vs  $89.0 \pm 3.0$  % Wilcoxon, Mann and Whitney;  $p=0.02$ ), extraction was satisfactory for the experimental conditions, since bromadiolone was quantifiable from the first to the last day of our experiment in all faeces samples. There was a good repeatability of the extraction procedure (coefficients of variation  $< 10\%$ , i.e., 8.9 and 8.8% in faeces, 4.3 and 3.4% in plasma for bromadiolone and IS, respectively). The mean retention times for bromadiolone and IS, regardless of tissue type, were 3.6 and 4.8 min, respectively. A typical LC/ESI/MS chromatogram monitoring the titration of faeces containing 0.9 $\mu\text{g}$  of bromadiolone/kg is shown in Figure 25. The validation procedure gave satisfactory results, and this technique offers much-improved sensitivity and selectivity over other existing HPLC methods. For example, in fox plasma, our LOD and LOQ are 30- to 40-fold lower than values observed for bromadiolone in HPLC by Berny et al. (2006) in sheep. Sensitivity in faeces increased approximately 10- to 30-fold in comparison to previous studies (Eadsforth et al., 1991; Gray et al., 1994; Newton et al., 1994) with other SGARs in Barn owl pellets. In comparison with recently published HPLC/ESI/MS-MS methods, our LOQ in plasma was the same as results reported by Jin et al. (2007) in human whole blood, while it was 10 times more sensitive than results reported by Grobosch et al. (2006) in human blood serum. In faeces, our LOQ was similar to those observed in animal feed, ground beef and drink mix by Marek et al. (2007).



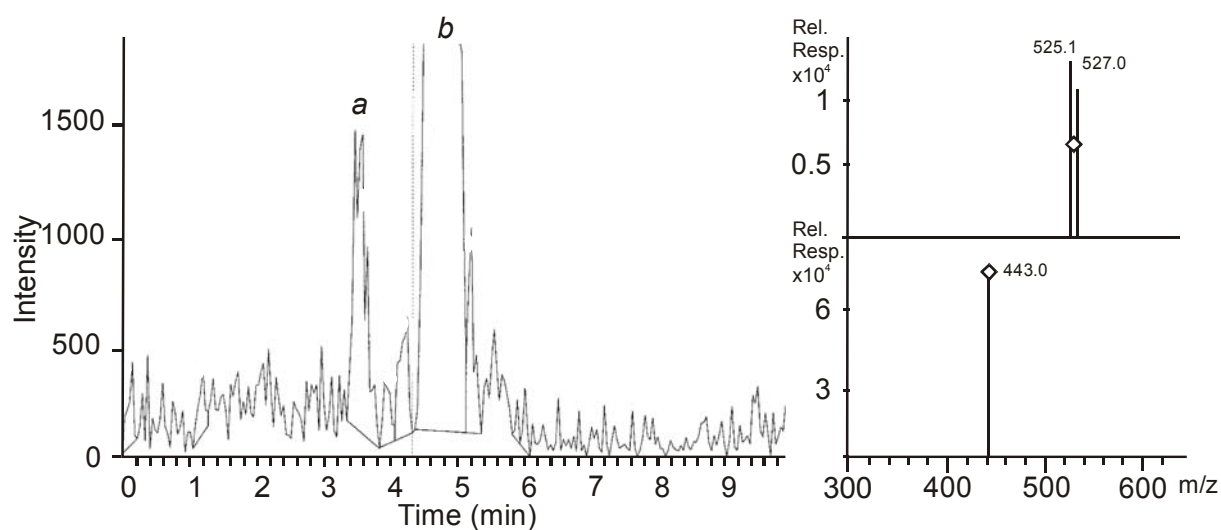


Figure 25. Chromatogram and mass spectrum for a blank faeces sample spiked at the LOD 0.9 µg/kg. (a) representing the bromadiolone peak and (b) the IS.

## 4.2 Fox feeding phase

We chose to feed foxes with spiked water voles to simulate exposure with a known quantity. This type of exposure did not consider the toxicity of eventual metabolites, binding or the distribution of the toxicant in intoxicated rodents; however, it allowed us to assess precisely the ingested dose of bromadiolone by foxes. Indeed, in previous studies, secondary poisoning of stone martens (*Martes foina*) (Lund and Rasmussen, 1986) and minks (*Mustela vison*) (Evans and Ward 1967) was evaluated by offering mice or nutria (*Myocastor coypus*) fed *ad libitum* on anticoagulant baits. However, in those cases, anticoagulant quantity administered to predators remained unknown and was highly dependent on natural variability of the concentration in anticoagulant-fed rodents (Sage et al., accepted). The captive foxes used in the present experiment are normally fed on dry food. The fox F5.3 did not eat all the rodents provided, and the fox F2 ate very little. As the experiment was performed outdoors during the summer, non-negligible parts of rodents discarded by the foxes were eaten by wasps. Thus, it was not possible to assess precisely the quantity of bromadiolone actually ingested by these two foxes. Therefore, we will express food consumption per fox in a semi-quantitative way; i.e., the fox F2 ate very little of the bromadiolone administered, F5.3 ate moderately and F5.1 and F5.2 ate the totality of the administered dose.

### 4.3 Kinetics of bromadiolone residues in faeces

While the control fox (F0) did not exhibit detectable residues in faeces during the experiment, bromadiolone was rapidly excreted by the exposed foxes and was detectable in all faeces from the first sampling, 15 hours after dosing (Figure 26.a). Concentrations increased for all foxes during the dosing. Maximal residues were observed in the middle of the exposure, on D3 for F5.1 with 6226.0 µg/kg, the next day of the exposure, on D5, for F5.2 and F5.3 with 5196.8 and 6320.8 µg/kg, respectively, and two days after the last exposure, on D3, for F2, with 480.3 µg/kg. Since the foxes ate voles contaminated at the same concentration, the maximal concentrations in faeces of F5.1, F5.2 and F5.3 were very close ( $5917.5 \pm 623.4$  µg/kg) and were, respectively, 12.9, 10.8 and 13.2 times greater than that of F2. The very small consumption of contaminated voles by F2 induced a bromadiolone excretion increase that was slower and a maximal concentration that was much lower than those of the other foxes. After this increase, concentration levels gradually decreased once dosing ceased. Disappearance half-life of bromadiolone in faeces ranged between 23.3 and 43.9 hours. Concentration decrease was the fastest for F2, and the excretion half-lives in faeces for the three F5 foxes were very close (Table 10). A small amount of bromadiolone continued to be excreted, and the molecule was still detectable in faeces of all exposed foxes until the end of the experiment. Thus, concentrations measured in faeces on D28 were 4.4, 53.0, 28.1 and 15.0 µg/kg for F2, F5.1, F5.2, and F5.3, respectively, and ranged from 7.8 to 96 times the LOD. Since bromadiolone residues were significantly above our LOD at the end of the experiment, we may suppose that the molecule is excreted and detectable longer after an exposure.

	Fox	Variance function	k (d <sup>-1</sup> )	min/max	p-value	half-life (hours)	r <sup>2</sup>
Plasma	F2	/	1,30 <sup>a</sup>	1,236/1,375	<0,001	12.7	0.99
	F5.1	varExp	0,86 <sup>b</sup>	0,766/0,964	<0,001	19.4	0.99
	F5.2	varExp	0,91 <sup>b</sup>	0,701/1,232	<0,001	18.2	0.97
	F5.3	varExp	0,23 <sup>c</sup>	0,167/0,307	<0,001	72.2	0.97
Faeces	F2	/	0.72 <sup>a</sup>	0.450/1.294	<0.001	23.3	0.85
	F5.1	/	0.38 <sup>b</sup>	0.248/0.608	<0.001	43.6	0.84
	F5.2	/	0.38 <sup>b</sup>	0.275/0.548	<0.001	43.4	0.90
	F5.3	/	0.38 <sup>b</sup>	0.249/0.601	<0.001	43.9	0.89

Minimum and maximum values are likelihood-based 95% confidence intervals. For one parameter, within the same  $k_0$ , values that share similar letters are not significantly different.

Table 10. Estimates of kinetic parameters for bromadiolone elimination kinetics in plasma and faeces for each fox.

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

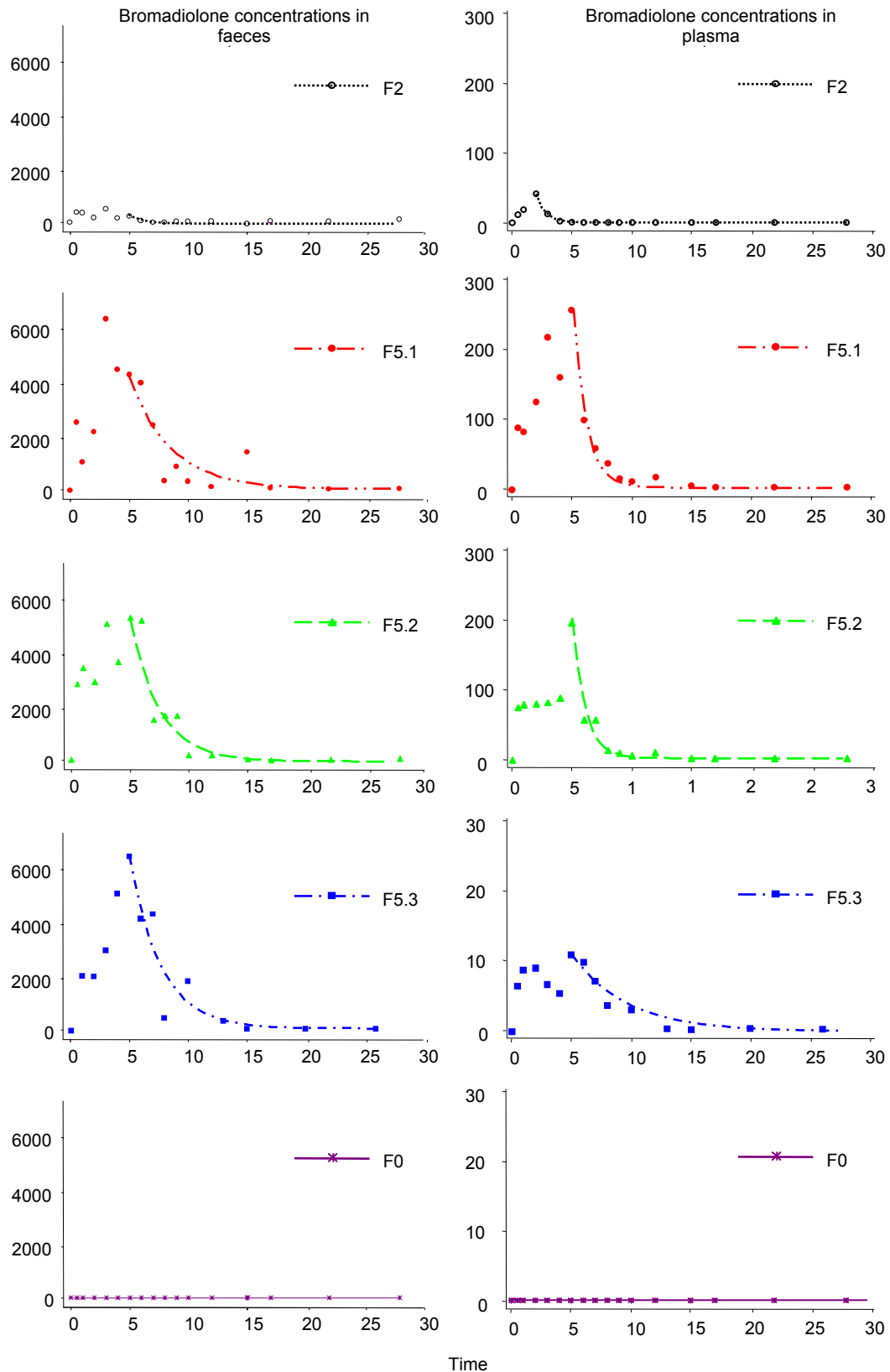


Figure 26. Graphic representing measures on foxes feeding on five water voles spiked with 200 $\mu$ g of bromadiolone/vole during two (F2) or five days (F5.1, F5.2, F5.3) and control (F0). Each point is the measure for each fox at one time for bromadiolone concentration in faeces (a) and bromadiolone concentration in plasma (b). Dotted lines are the expected curves as fitted by the computer with the one-compartment model derived from Widianarko and Van Straalen (1996).

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

For technical reasons, stall conditions of F5.1 and F5.2 only allowed for collecting a significant portion of faeces each day (at least 75%). Measured concentrations might therefore be generally considered as representative of the total faeces excreted, but the quantity excreted per day for these two foxes might be underestimated. Despite that, the moderate consumption of voles by F5.3 induced excreted quantities lower than those of F5.1 and F5.2 (Figure 27.a). The quantity of excreted bromadiolone reflected the vole consumption for each fox, and maximal values were observed either in the middle of the exposure, the next day or two days after exposure, with 6.2, 69.9, 73.3 and 26.6  $\mu\text{g}$  for F2, F5.1, F5.2 and F5.3, respectively. The highest concentrations were observed on D4 for F5.1 and F5.2, D10 for F5.1 and D15 for F5.3 (Figure 26.a); however, bromadiolone quantity excreted those days was low, due to a smaller mass of faeces on those particular days. It makes sense that, for the same bromadiolone quantity excreted, small faeces had higher concentrations than big ones and big faeces had lower concentrations than small ones. The greatest portion of bromadiolone ingested on D0 by F5.1 and F5.2 seems to have been excreted and sampled from H15. As no new exposure was made between H15 and D1, this may explained why the quantities measured on D1 for these two foxes were low.

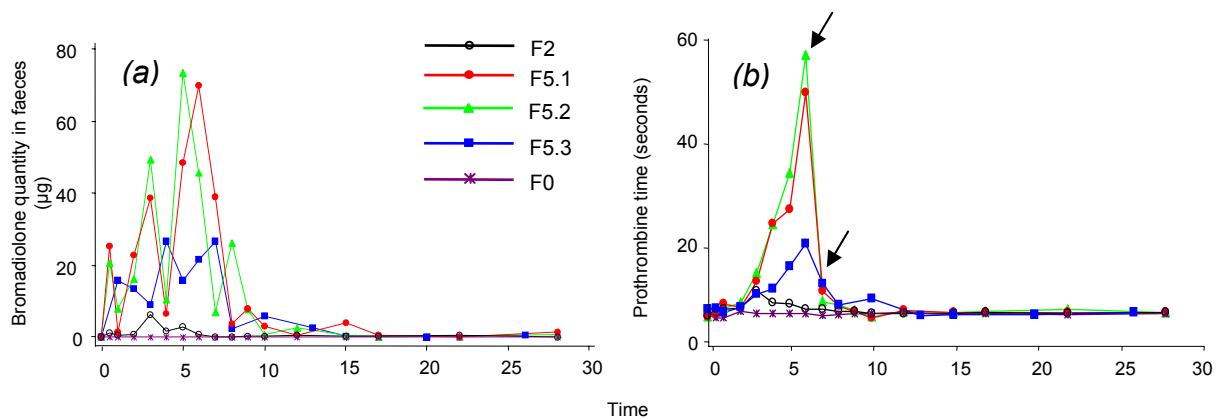


Figure 27. Graphic representing measures on foxes feeding on five water voles spiked with 200 $\mu\text{g}$  of bromadiolone/vole during two (F2) or five days (F5.1, F5.2, F5.3) and control (F0). Each point is the measure for each fox at one time for bromadiolone quantity in faeces (a), and values for each fox represent the mean of two measurements of Prothrombin Time (b). Unbroken lines connect points only to facilitate reading. Vitamin K1 administration is represented by the two arrows.

The calculated excretion half-life corresponds to the time for a fox to excrete faeces contaminated at concentrations divided by two, compared with concentrations observed the day after the last exposure. The presence of bromadiolone in faeces might be due to two processes: (1) the non-absorption by the gastrointestinal tract of the total bromadiolone ingested and its direct excretion via faeces; (2) a biliary excretion via faeces of the parent molecule after elimination from the liver (Lipha, 1987). To our knowledge, no data are available concerning the intestinal transit duration for foxes fed with rodents, but rodent hairs were present in faeces until 5 to 7 days after returning to dry food. So, we might suppose that

bromadiolone in faeces could be due the first time to both processes mentioned above and then could gradually become due to biliary excretion only, explaining the longer term detection of bromadiolone in faeces after exposure.

Unfortunately, as the quantity of bromadiolone ingested by F2 and F5.3 was unknown, and the quantity excreted by F5.1 and F5.2 might be underestimated, our results did not allow us to establish an exact relationship between ingested and excreted quantity. Bromadiolone concentration observed in faeces seems to be closely related to the food contamination, but it does not seem to be related to the ingested dose. Our study demonstrates that both concentration and quantity of bromadiolone in faeces are complementary and essential for understanding the ingested bromadiolone dose.

#### **4.4 Toxicological data and fox health conditions**

##### ***4.4.1 Kinetics of bromadiolone in plasma***

While the control fox (F0) did not show detectable residues in plasma during the experiment, bromadiolone was absorbed from the gastrointestinal tract at a relatively rapid rate and was detectable in plasma of all exposed foxes from the first sampling (15 hours after exposure; Figure 26.b.). During the exposure period, assimilation processes were higher than those of biotransformation and elimination, since bromadiolone plasma concentrations continually increased to reach a peak on the day following the end of the exposure period (D2 for the fox F2 with 41.6 µg/L and D5 for the foxes F5.1, F5.2 and F5.3, with 255.3, 195.3 and 107.2 µg/L, respectively). Maximal concentrations measured in foxes F5.1, F5.2 and F5.3 were 6.1, 4.7 and 2.6 times greater than in F2, respectively. All foxes were exposed to the same bromadiolone dose during the two first days of the experiment and should have exhibited similar plasma concentrations. However, the very small consumption of contaminated voles by F2, and the moderate consumption by F5.3, might explain why the F2 plasma concentrations increased more slowly than did those of the others, and why those of F5.3 showed alternation of stability, decrease and increase during the exposure period.

According to the literature, bromadiolone residues were detectable in rat plasma one hour after oral administration in solution by stomach tube, and maximum levels were attained six to nine hours after ingestion (Nahas, 1986). The rapid assimilation of bromadiolone may explain why, in our study, it was detectable from the first sampling and why maximum residues were observed the day following the last exposure. Next, biotransformation and elimination were higher than accumulation processes. As was previously reported in rats (Nahas 1987), we showed that bromadiolone elimination exhibited a biphasic-exponential pattern and was no more detectable in plasma 7 to 24 days after the last dosing for the fox

F2 and the three foxes F5, respectively. Our calculated half-lives ranged between 12.7 and 72.2 hours (Table 10); however, nothing was done to correct for possible hypovolaemia as a result of blood sampling and loss with haemorrhages. Our results could be improved with a larger sampling frequency (e.g., more than three blood samplings within the half-life duration (Toutain and Bousquet-Mélou 2004)). Our study provides base line values for a more accurate estimation of the slope of the concentration decrease curve. Our study did not confirm results of Lippa (1987), who demonstrated an increase of half-life with the ingested dose for rats. While F2 and F5.3 ingested a smaller bromadiolone quantity than F5.1 and F5.2, the fox F2 exhibited a first elimination phase more quickly than did the other three. On the other hand, the fox F5.3 exhibited a first bromadiolone elimination phase slower than F5.1 and F5.2 (Table 1). Nevertheless, during the second elimination phase, after reaching pseudo-equilibrium, bromadiolone residues in plasma of the most severely intoxicated foxes persisted longer than in the others (Figure 26.b). In accordance with Toutain and Bousquet-Mélou (2004), we confirmed that persistence of a drug in a body is influenced by pharmacokinetic parameters specific to molecule and species but is also increased with the ingested dose and is especially relevant to multiple dosing regimens.

Our calculated bromadiolone plasma half-lives were included in the reference range for other species (Erickson and Urban, 2002), but our data confirmed their variability across mammals (e.g., from 26 to 58 hours in rat plasma (Nahas, 1986) and around 20 hours in cattle (Puyt et al. 2000)). Unfortunately, other literature data described the most common anticoagulant kinetics in plasma for poisoning diagnosis. Because the date of the exposure remained unknown in these cases, it was impossible to compare our results with those data on different species for bromadiolone (Binev et al., 2005; Jin et al., 2007; Robben et al., 1998) or other anticoagulants (Hollinger and Pastoor, 1993).

#### **4.4.2 Reference values of Blood-clotting test**

The APTT and the kAPTT/KCT of the 10 control foxes have shown very high variability between individuals, ranging from 53.1 to 205.6 s (mean =  $138.1 \pm 56.8$ ) and from 12.8 to 210.4 s (mean =  $126.4 \pm 76.4$ ), respectively. With PT, these two tests were commonly used to confirm anticoagulant poisoning of mammals, for instance of rats (Batten and Bratt, 1990) or dogs (Mount, 1988). However, in our study, the high variability of these two tests prevented exploitable results. This high variability had never been reported in other species (e.g., dogs (Mount, 1988)). Kit reagents might not be adapted for foxes and should be tested in a further experiment. On the other hand, we showed a notable stability of the PT (mean =  $8.4 \pm 1.9$ ) for the ten control foxes. Although they had not been exposed to anticoagulants

before, one of them had a PT of 13.7 seconds (measures repeated during three days for this fox), a value 63% higher than the mean of the reference range. This outlier indicates a need for caution in interpreting isolated values measured in the field without reference values for each individual. Numerous other coagulation disorders, such as disseminated intravascular coagulopathy, hepatic disease, and hereditary coagulopathies, may influence the PT assay (Mount et al., 2003). Despite this fact, PT is the first blood-clotting time to be prolonged in anticoagulant rodenticide toxicosis and is considered the most sensitive among the 3 tested here (Woody et al., 1992). Therefore, we only measured PT on foxes of the experiment. Before dosing, the F0, F2, F5.1, F5.2 and F5.3 exhibited a PT of 7.8, 7.0, 6.8, 6.9 and 8.3 seconds, respectively. Beklova et al. (2007) reported a PT value of 7.7–9.2 seconds from one six-month-old healthy fox. Our measured PT on controls and initial baseline values of exposed foxes allows us to propose reference data of 8.0 s on average (median = 7.7 ; 95% CI 7.4-8.9) for several individuals (n=15). Those values include the data of Beklova et al. (2007) and fall within the reference range from seven to nine seconds reported for dogs (The merck veterinary manual, 2005).

#### ***4.4.3 Relationships between PT kinetics and intoxication clinical signs***

The results clearly show an increase in clotting time in foxes that had received contaminated voles compared with pre-treatment baseline values and values of the 10 uncontaminated foxes. The control fox (F0) PT remained unchanged (ranged from 6.7 to 7.4 s) (Fig 3.b.). Bromadiolone effects were evident (PT > 25% greater than the pre-exposure value) on D3 for F2 and F5.3 and appeared more quickly (within 24 h of feeding contaminated voles) for F5.1 and F5.2 (PT +26 and 37%, respectively on D1). After reaching a maximum value of 11.7 s on D3, the PT of F2 decreased gradually within the reference range on D9-10. A similar pattern was observed for F5.3 with a maximum of 20.8 s on D6 and a decrease to within reference range on D13. Concerning F5.1 and F5.2, the gradual prolongation of PT during the three first days was followed by an exponential increase and was multiplied by (on average) 8 and reached 50.0 and 57.2 s on D6, respectively. This pattern is in accordance with the vitamin K-dependent coagulation factor decrease described by Mount et al. (1989). As was also described by Lorgue et al. (1985) and Kemikalieinspektionen (2006), severe signs related to bleeding were observed 5 to 6 days after the first bromadiolone administration in the two most intoxicated foxes, F5.1 and F5.2. These included depression, lethargy, weakness, mucous membrane pallor, melena and haematoma developed over the venipuncture site. Clinical signs became more intense on D6, especially for F5.2, with acute respiratory distress, profuse bleeding from the penis

sheath and incessant bleeding of a venipuncture site. Therefore, F5.1 and F5.2 were immediately treated with vitamin K1 on D6. Then, an obvious decrease in the PT and, as reported by Mount and Feldman (1982), a return to the normal reference range were observed within 24 hours. Twelve hours after antidote administration, foxes were normal in both clinical signs and behaviour. As described for other species (Kemikalieinspektionen, 2006; Lorgue et al., 1985), we can assume that F5.1 and F5.2 would probably have died 1 or 2 days later without antidote injection. SGARs such as bromadiolone have a “long-acting” anticoagulation effect in animals (Erickson and Urban, 2002), and bromadiolone was still present in the plasma and liver of the poisoned foxes during at least 23 days after the last exposure (see discussion below). However, contrary to what is usually reported (Mount, 1988), no PT increase was observed after the interruption of treatment on D7. Prothrombin time remained within the reference range for the duration of the study without additional antidote administration. In accordance with Robben et al. (1998), the consumed dose was low, and concentrations were probably lower than toxic values at that time.

Following the autopsy, the foxes F2 and F5.3, which did not exhibit external signs of poisoning, had evidence of a moderate bleeding diathesis consistent with the pharmacological action of the active substance (Mount 1988; i.e., internal haemorrhages in abdominal fat and ecchymosed into the thoracic cavity). The foxes F5.1 and F5.2 exhibited more severe signs of hemopericardium, hemomediastinum, mesenteric myocardial and pulmonary haemorrhages, as well as haemorrhages into the pleural cavity and subcutaneous tissues of the abdominal neck.

#### **4.4.4 Bromadiolone concentrations in liver**

Bromadiolone analyses of the liver demonstrated that large amounts of the molecule were retained in this tissue at least 24 to 26 days following exposure; no bromadiolone residues were observed in the control fox F0. While residues were no longer detectable in plasma, the liver exhibited residues in proportion with the acuteness of clinical signs observed. However, concentrations were all within a small range (i.e., 2.00, 2.54, 2.11 and 2.04 mg/kg in F2, F5.1, F5.2 and F5.3, respectively).

Liver residues of our study may be compared to those reported in studies based on carcass collections from wildlife disease surveillance networks. Berny et al. (1997) confirmed poisoning of field foxes by a liver threshold of 0.2 mg/kg (corresponding to their routine LOD) and/or lesions consistent with anticoagulant poisoning. These parameters were also accepted for other carnivorous species by other authors (Barnett et al., 2006; Erickson and Urban, 2002; Fournier-Chambrillon et al., 2004). However, although a threshold value is a useful guide, to determine a “significant toxicological” liver concentration is a challenging



problem that is affected by many variables, and the different studies demonstrate the high variability of the data. Berny et al. (1997) described liver concentrations ranging from 0.8 to 6.9 (median = 1.5 mg/kg) in confirmed bromadiolone-poisoned foxes. In the study of Beklova et al. (2007), a fox fed for 5 days with 5 pheasants previously exposed to bromadiolone baits exhibited a liver concentration of 0.198mg/kg after death. However, no information was provided on the duration between exposure and death. This situation is complicated by the long time persistence of anticoagulants in the liver. For instance, the half-life of the second decline phase in rats is 318 days (Lipha, 1991; USEPA 1998). Also, many animals may have detectable residues of anticoagulants in their liver, but another cause of death (e.g., trauma, infectious disease) has been attributed in these cases (Fournier-Chambrillon et al., 2004; Shore et al., 2003). The relationship between the dose of an anticoagulant ingested and the level retained in the liver remains complex and is poorly understood, exhibiting a large inter-individual variability (Hegdal and Colvin, 1988). Our study brings original information concerning bromadiolone residue in fox liver that can be related to animal death. For instance, the two captive foxes with liver concentrations of 2.00 and 2.04 mg/kg 24 and 26 days after exposure, respectively, exhibited signs of only moderate internal haemorrhages. Others foxes with liver residues of 1.06 and 1.27 times higher than the value of the foxes mentioned above probably would have died without an antidote injection. Thus, measured concentration in livers in the field is difficult to interpret. In addition to an appropriate LOD for residue analysis, an important piece of evidence in determining poisoning is post-mortem information with the degree of haemorrhages.

#### ***4.4.5 Implication of toxicity data on risk assessment***

To our knowledge, this is the first time that the PT kinetics after repeated ingestion of an anticoagulant has been investigated in a wild carnivore. The susceptibility to bromadiolone varies considerably among mammal species (USEPA 1998). The present data showed that foxes are apparently more sensitive to bromadiolone than dogs. Prothrombin times twice as long (122s) as the maximal values observed when our foxes exhibited the most severe symptoms were already observed in a dog before antidote treatment and recovery (Binev 2005). Moreover, the dose inducing lethal symptoms on all our foxes that ingested the total administrated dose is listed as the smallest lethal dose for dogs in the literature and is 3.3 times less than 500 µg/kg/day, the LD<sub>50</sub> after 5 days of exposure (Petterino and Paolo, 2001). Moreover, our study demonstrated that, after bromadiolone administration, the drug was not entirely eliminated at the time of the second administration, and plasma concentrations increased progressively with the repetition of dosing at the same dose rate, according to the superposition principle (Toutain and Bousquet-Mélou, 2004).

These residual tissue concentrations in liver and in plasma to may have consequences for predators and lead to accumulation following repeated sublethal exposure.

To date, laboratory experiments (i.e., Grolleau et al., 1989) have been in contradiction with massive secondary poisoning hazards recorded in the field (Berny, 2007; Berny et al., 1997; SAGIR, 1990-2007). Our study realistically demonstrated that a captive fox feeding on contaminated voles for 5 days (a likely consumption under natural conditions) may die. Moreover, wild foxes are probably more sensitive than our captive foxes that were housed individually, thereby reducing movements and development of haemorrhages (Petterino and Paolo, 2001; Woody et al., 1992).

#### **4.5 Relationship between bromadiolone residues in faeces, toxicological data and clinical signs**

**Detection of a recent and a long-standing exposure** – Analysis of bromadiolone residues in liver is probably the best way to detect a recent and a long standing exposure, but it requires the death of animals (Erickson and Urban, 2002). Concerning non-invasive markers, the response time of the coagulation system and PT assay presented a snapshot of the exposure before 24 to 72 hours. On the other hand, bromadiolone analyses in plasma and faeces was sensitive enough to detect a recent exposure prior to 15 hours, whatever the quantity ingested by the fox. The assessment of fox exposure to moderate intoxication (e.g., F2) by bromadiolone analyses in faeces was possible during a period at least 1.6 and 2.6 times longer than by plasma residues or PT measurement, respectively. For foxes exposed over 5 days, bromadiolone analysis in faeces was more sensitive also, since residues were well above the LOD the last day of exposure, while no residues were detectable in plasma. Therefore, unlike with other non-invasive direct-markers tested, analyses of faeces might determine if a fox has been exposed to bromadiolone from 15 hours until at least 26 days after feeding on a contaminated vole.

**Measure sensitivity according to exposure** – Bromadiolone concentration in liver at the end of the experiment did not permit the establishment of an obvious difference between exposure levels of foxes. Prothrombin time was considered to be a sensitive non-invasive marker of effect for vitamin K antagonism (Erickson and Urban, 2002; Mount et al., 2003), and it closely reflected fox health conditions according to the exposure. However, high values of one control make us cautious concerning PT isolated values. Plasma concentration shows a picture of the actual intensity of exposure. However, we have shown that it is not sensitive enough for a long-standing exposure. Both bromadiolone concentration and quantity measured in faeces are complementary, are related to the dose ingested one or two

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

---

days before, and soften the effect of intestinal transit disturbance and natural variations. According to our results, distinct situations were observed and are suggested in Table 11.

According to our feeding protocol, bromadiolone residues detected in faeces were higher than the LOD of the analytical method, and concentration data did not reach saturation point at the maximal exposure period. This indicates that lower and higher exposures than those tested here should be easily detectable. As anticoagulants are more toxic when ingested for several days (USEPA, 1998), ideally, to determine the poisoning risk for a fox, several samples taken at intervals of a few days would be better than isolated sampling. In this case, it would be possible to detect an increasing, constant or decreasing exposure. To our knowledge, this is the first time that the bromadiolone detection in faeces of a field rodent predator has been investigated. It was possible, in a complex matrix, thanks to the development and validation of an LC/MS/ESI assay with a high quality of analysis and a low LOD. This represents an appropriate approach for monitoring recent or a long-standing fox exposure to bromadiolone, not only at the individual level but at the population level. It will be possible to compare whether the severity of exposure changed between two periods, two places or two baiting strategies. This non-invasive method, applicable without mortality, could help to develop a survey programme for wildlife exposure to SGARs based on a rational sampling and analysis of faeces.

---

#### **Bromadiolone concentration and quantity measured in faeces collected over 24 hours**

---

##### **Fox health conditions**

---

#### 1. Not detectable

---

- a. Never exposed or currently exposed to a very very small quantity inferior to those tested in this study
  - b. Exposed to a non-lethal dose at least 26 days prior
- 

#### 2. Very low concentration (i.e., < 1000 µg/kg) and very low quantity (i.e., < 10 µg)

---

- a. Currently faintly exposed (cases of F2),
  - b. Exposed to a non-lethal dose more than 7-8 days ago and less than 26 days ago (case of F5.3)
- 

#### 3. Low concentration (i.e., from 1000 to 2000 µg/kg) and low quantity (i.e., from 10 to 30 µg)

---

- a. Recently highly exposed
  - b. Highly exposed 3-4 days ago.
- 

#### 4. High concentrations (i.e., > 2000 µg/kg) and low quantity (i.e., from 10 to 30 µg)

---

Currently exposed to the equivalent of one or two contaminated voles - if this exposure is lower than five days, this exposure is potentially non-lethal (case of F5.3).

---

#### 5. High concentrations (i.e., > 2000 µg/kg) and high quantity (i.e., > 30 µg)

---

Currently exposed to equivalent of five contaminated voles – if this exposure is longer than five days, this exposure is potentially lethal (case of F5.1 and F5.2).

---

Table 11. Different possibilities of fox health conditions observed in function of bromadiolone concentration and quantity measured in faeces.

## 5. Acknowledgements

This study received support from the *Conseils généraux* of the Doubs and the Jura departments and from the *Région of Franche-Comté*. We are grateful to F. Cliquet and M. Munier of the AFSSA and to E. Benoit of the ENVL for their hospitality, participation and technical support.

## 6. References

- AGRITOX INRA, Fiche d'information sur les substances actives phytopharmaceutiques - Bromadiolone / Lipha. <http://www.inra.fr/aritox.2004>.
- Alterio, N., 1996. Secondary poisoning of stoats (*Mustela erminea*), feral ferrets (*Mustela furo*), and feral house cats (*Felis catus*) by the anticoagulant poison, brodifacoum. *New Zealand Journal of Zoology*. 23, 331-338.
- Alterio, N., Brown, K. P., Moller, H., 1997. Secondary poisoning of mustelids in a new Zealand *Northfagus* forest. *Journal of Zoology (London)*. 243, 863-869.
- Artois, M., 1989. Le Renard roux (*Vulpes vulpes Linnaeus*, 1758). In: M. Artois, P. Delattre, Eds., *Encyclopédie des carnivores de France*, SFPEM, Nort/Erdre, pp. 90.
- Barnett, E. A., Fletcher, M., Hunter, K., Taylor, M. J., Sharp, A. E., 2006. Pesticide poisoning of animals in 2006 - Investigations of suspected incidents in the United Kingdom. In: d. D. f. E. F. a. R. Affairs), (Ed.), *A report of the Environmental Panel of the Advisory Committee on Pesticides 2007*, London: Defra.
- Batten, P., Bratt, H., 1990. Brodifacoum: Elimination From the Tissues of Rats Following Administration of Single Oral Doses: Lab Project Number: UR0172: UR0211: CTL/P/1559. Unpublished study prepared by ICI Central Toxicology Laboratory. 65 pp.
- Beklova, M., Krizkova, S., Supalkova, V., Mikelova, R., Adam, V., Pikula, J., Kizek, R., 2007. Determination of bromadiolone in pheasants and foxes by differential pulse voltametry. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*. 87, 459-469.
- Berny, P., 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 30, 93-100.
- Berny, P., de-Oliveira, L., Videmann, B., Rossi, S., 2006. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *American Journal of Veterinary Research*. 67, 363-371.
- Berny, P. J., Buronfosse, T., Buronfosse, F., Lamarque, F., Lorgue, G., 1997. Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*. 35, 1817-1829.
- Binev, R., Petkov, P., Rusenov, A., 2005. Intoxication with anticoagulant rodenticide bromadiolone in a dog - a case report. *Veterinarski Arhiv*. 75, 273-282.
- Boermans, H. J., Johnstone, I., Black, W. D., Murphy, M., 1991. Clinical signs, laboratory changes and toxicokinetics of brodifacoum in the horse. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 55, 11-27.

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

---

- 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, 118-128.
- Brown, K. P., Alterio, N., Moller, H., 1998. Secondary poisoning of stoats (*Mustela erminea*) at low mouse (*Mus musculus*) abundance in a New Zealand *Nothofagus* forest. *Wildlife Research*. 25, 419-426.
- Burnham, K. P., Anderson, D. R., 2004. Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. *Sociological Methods Research*. 33, 261-304.
- Eadsforth, C. V., Dutton, A. J., Harrison, E. G., 1991. A Barn owl feeding study with [<sup>14</sup>C] flocoumafen-dosed mice : validation of a non-invasive methode of monitoring exposure of Barn Owls to anticoagulant rodenticides in their prey. *Pesticide Science*. 32, 105-119.
- Eason, C. T., Milne, L., Potts, M., Morriss, G., Wright, G. R. G., Sutherland, O. R. W., 1999. Secondary and tertiary poisoning risks associated with brodifacoum. *New Zealand Journal of Ecology*. 23, 219-224.
- Eason, C. T., Murphy, E. C., Wright, G. R. G., Spurr, E. B., 2002. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zeland. *Ecotoxicology*. 11, 35-48.
- Eason, C. T., Spurr, E. B., 1995. Review of the toxicity and impacts of brodifacoum on non-target wildlife in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*. 22, 371-379.
- Erickson, W., Urban, D., 2002. Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mammals: a Comparative Approach. Vol. 1. United States Environmental Protection Agency, Washington DC., 2002, pp. 198 pp.
- Evans, J., Ward, L., 1967. Secondary poisoning associated with anticoagulant-killed nutria. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 15, 1, 856-861
- Fournier-Chambrillon, C., Berny, P., Coiffier, O., Barbedienne, P., Dassé, B., Delas, G., Galineau, H., et al., 2004. Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implication for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *Journal of Wildlife Diseases*. 40, 688-695.
- Giraudoux, P., Tremolières, C., Barbier, B., Defaut, R., Rieffel, D., Bernard, N., Lucot, E., et al., 2006. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environmental Research*. 102, 291-298.
- Gray, A., Eadsforth, C. V., Dutton, A. J., 1994. Non-invasive methode for monitoring the exposure of Barn Owls to second-generation rodenticides. *Pestic Sci.* 41, 339-343.
- Grobosch, T., Angelow, B., Schonberg, L., Lampe, D., 2006. Acute bromadiolone intoxication. *Journal of Analytical Toxicology*. 30, 281-286.
- Grolleau, G., Lorgue, G., Nahas, K., 1989. Toxicité secondaire, en laboratoire, d'un rodenticide anticoagulant (bromadiolone) pour des prédateurs de rongeurs champêtres: Buse variable (*Buteo buteo*) et Hermine (*Mustela erminea*). *Bulletin OEPP/EPPO*. 19, 633-648.
- Hegdal, P. L., Colvin, B. A., 1988. Potential hazard to eastern screech-owls and other raptors of brodifacoum bait used for vole control in orchards. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 7, 245-260.
- Hollinger, B. R., Pastoor, T. P., 1993. Case management and plasma half-life in a case of brodifacoum poisoning. *Arch Intern Med*. 153, 1925-1928.
- Howald, G. R., Mineau, P., Elliott, J. E., Cheng, K. M., 1999. Brodifacoum Poisoning of Avian Scavengers During Rat Control on a Seabird Colony. *Ecotoxicology*. 8, 431-447.

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

---

- Hunter, K., 1983a. Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. I. Fluorescence detection using post-column techniques. *Journal of Chromatography*. 270, 267-276.
- Hunter, K., 1983b. Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. II. Fluorescence detection using ion-pair chromatography. *Journal of Chromatography*. 270, 277-283.
- Jin, M.-C., Ren, Y.-P., Xu, X.-M., Chen, X.-H., 2007. Determination of bromadiolone in whole blood by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Forensic Science International*. 171, 52-56.
- Johnstone, I.B., 1988. Clinical and laboratory diagnosis of bleeding disorders. In: Feldman BF. Ed. *The veterinary clinics of North America: small animal practice*. Philadelphia: WB Saunders. 21-33.
- Kemikalieinspektionen, S. C. I., 2006. Competent authority report according to directive 98/8/EC Bromadiolone Cas 28772-56-7; Sweden.
- Kolf-Clauw, M., Alvarez, E., Matray, O., 1995. Anticoagulant rodenticides : étiologie, diagnostic et traitement des intoxications. *Recueil de Médecine Vétérinaire. Spécial toxicologie des carnivores domestiques*, 127-134.
- Kupper, J., Grobosch, T., Kistler, R., Sydler, T., Naegeli, H., 2006. Bromadiolone poisoning in foxes. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*. 148, 405-408.
- Lambert, O., Pouliquen, H., Larhantec, M., Thorin, C., L'Hostis, M., 2007. Exposure of raptors and waterbirds to anticoagulant rodenticides (Difenacoum, bromadiolone, coumatetralyl, coumatfen, brodifacoum): Epidemiological survey in loire atlantique (France). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 79, 91-94.
- Lipha., 1987. Kinetics of Bromadiolone, anticoagulant rodenticide, in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). ENVL – INRA, France. The Italian Pharmacological Society, *Pharmacological research Communications Vol 19 No. 11*, 767-775.
- Lipha., 1991. Determination of the residues and the half-life of the rodenticides Brodifacoum, Bromadiolone and Flocoumatfen in the livers of rats during 200 days after a single oral dose of each at a dose level of 0.2 mg/kg. Non-public. Laboratory report no. LPA 158/891590 GLP/Unpublished
- Lorgue, G., Mally, C., Nahas, K., 1985. Traitement de l'intoxication par la bromadiolone, rodenticide anticoagulant, chez le chien. *Recueil de Médecine vétérinaire*. 161, 329-334.
- Lund, M., Rasmussen, A. M., 1986. Secondary poisoning hazard to stone martens (*Martes foina*) fed bromadiolone-poisoned mice. *Nordik Veterinary-Medicine*. 38, 241-243.
- Marek, L. J., Koskinen, W. C., 2007. Multiresidue Analysis of Seven Anticoagulant Rodenticides by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 55, 571-576.
- McDonald, R. A., Harris, S., Turnbull, G., Brown, P., Fletcher, M., 1998. Anticoagulant rodenticides in stoats (*Mustela erminea*) and weasels (*Mustela nivalis*) in England. *Environmental Pollution*. 103, 17-23.
- The Merck Veterinary Manual 2005. by Cynthia M. Kahn and Scott Line (Editor); 9 edition (February 8, 2005)
- Mitchell-Jones, A.J.J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Krystufek, B., Reijnders, P., Spitzenberger, P., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohralik, V., Zima, J., 1999. *The Atlas of European Mammals* Publisher: Poyser, T. & A. D. Limited for the Societas Europaea Mammalogica ISBN-13: 9780856611308 484pp

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

---

- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2002. Arrêté ministériel du 17 décembre 2001 relatif aux conditions d'emploi de la bromadiolone pour la lutte contre le Campagnol terrestre. J.O. n° 25 du 30 janvier 2002, p. 2015.
- Mount, M. E., 1988. Diagnosis and therapy of anticoagulant rodenticide intoxicants. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. 18, 115-130.
- Mount M.E., Feldman, B.F., 1982. Vitamin K and its therapeutic importance. *J Am Vet Med Assoc*. 11, 1354-1356
- Mount, M. E., Kass, P. H., 1989. Diagnostic importance of vitamin K1 and its epoxide measured in serum of dogs exposed to an anticoagulant rodenticide. *American Journal of Veterinary Research*. 50, 1704-1709.
- Mount, M. E., Kim, B. U., Kass, P. H., 2003. Use of a test for proteins induced by vitamin K absence or antagonism in diagnosis of anticoagulant poisoning in dogs: 325 cases (1987-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 222, 194-198.
- Murphy, E. C., Clapperton, B. K., Bradfield, P. M. F., Speed, H. J., 1998. Brodifacoum residues in target and non-target animals following large-scale poison operations in New Zealand podocarp-hardwood forests. *New Zealand Journal of Zoology*. 25, 307-314.
- Nahas, K., 1986. Dosage de la bromadiolone (rodenticide anticoagulant) dans le plasma, le foie et le rein du rat. *Journal of Chromatography*. 369, 445-448.
- Newton, I., Wyllie, I., Gray, A., Eadsforth, C. V., 1994. The Toxicity of the Rodenticide Flocoumafen to Barn Owls and Its Elimination via Pellets. *Pestic Sci*. 41, 187-193.
- Petterino, C., Paolo, B., 2001. Scientific reviews - Toxicology of various anticoagulant rodenticides in animals. *Vet. Human Toxicol*. 46, 353-360.
- Pineiro, J. C., Bates, D. M., 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-Plus*. New York.
- Puyt, J.D., Sachot, E., Larhantec-verdier, M., et al., 2000. Oral bioavailability of bromadiolone in cows (abstr), in *Proceedings. 9<sup>th</sup> Meet Eur Assoc Vet Pharmacol toxicol*.
- R Development Core Team, 2004. *R: A language and environment for statistical computing*. ISBN 3-900051-00-3. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raoul, F., Michelat, D., Ordinaire, M., Decote, Y., Aubert, M., Delattre, P., Deplazes, P., et al., 2003. *Echinococcus multilocularis*: secondary poisoning of fox population during a vole outbreak reduces environmental contamination in a high endemicity area. *International Journal for Parasitology*. 33, 945-954.
- Robben, J. H., Kuijpers, E. A. P., Mout, H. C. A., 1998. Plasma superwarfarin levels and vitamin K1 treatment in dogs with anticoagulant rodenticide poisoning. *The Veterinary Quarterly*. 20, 24-27.
- Sage, M., Coeurdassier, M., Defaut, R., Gimbert, F., Berny, P., Giraudoux, P., Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of the water vole, *Arvicola terrestris*, *Science of the total environment*, 407, 211-222
- SAGIR, Traitement de campagnols aux anticoagulants. 1990-2007. Evaluation de la mortalité de la faune non cible dans le Doubs. Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage. Doubs, France.
- Sakamoto, Y., Ishiguro, M., Kitagawa, G., 1996. *Akaike Information Criterion Statistics*. D. Reidel Publishing Company.
- Shore, R. F., Birks, J. D. S., Afsar, A., Wienburg, C. L., Kitchener, A. C., 2003. Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. *Environmental Pollution*. 122, 183-193.

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

---

- Siegel, S., Castellan, N. J., 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. Mc Graw-Hill International, New York.
- Sokal, P. R., Rohlf, F. J., 1997. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Compagny, New York, USA.
- Stone, W. B., Okoniewski, J. C., Stedelin, J. R., 2003. Anticoagulant Rodenticides and Raptors: Recent Findings from New York,. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 70, 34-40.
- Toutain, P. L., Bousquet-Mélou, A., 2004. Plasma terminal half-life. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 27, 427-439.
- USEPA, 1998. Registration Eligibility Decision (RED) Rodenticide Cluster. EPA 738-R-98-007. Environmental Protection Agency, United States.
- Walker, L. A., Turk, A., Long, S. M., Wienburg, C. L., Best, J., Shore, R. F., 2008. Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. Science of The Total Environment. 392, 93-98.
- Weber, J.M., Aubry, S., 1993. Predation by foxes, *Vulpes vulpes*, on the fossorial form of the water vole, *Arvicola terrestris scherman*, in western Switzerland. J. Zool. London 229, 553–559.
- Widianarko, B., Van Straalen, N., 1996. Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry. 15, 402-406.
- Woody, B. J., Murphy, M. J., Ray, A. C., Green, R. A., 1992. Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine. 6, 23-28.



## 7. En bref

Une méthode analytique sensible en LC-ESI-MS permettant d'analyser les résidus de bromadiolone dans des fèces de renard a été mise au point.

Un renard se nourrissant en captivité de campagnols intoxiqués excrète de la bromadiolone dès 15 heures après la 1<sup>ère</sup> ingestion et au minimum jusqu'à 23 jours après sa dernière ingestion.

Les résidus de bromadiolone dans les fèces décrivent une augmentation continue pendant la durée de l'exposition et décroissent progressivement dès le lendemain de la dernière ingestion.

Plus un renard ingère de bromadiolone, plus on en retrouve dans ses fèces et plus les signes cliniques d'intoxication qu'il présente sont élevés.

L'analyse de bromadiolone dans les fèces est plus sensible que celle dans le plasma et permet de détecter la molécule plus longtemps après son ingestion.

Les concentrations en bromadiolone mesurées dans le foie des renards à la fin de l'expérimentation sont toutes très proches de 2 mg kg<sup>-1</sup> alors que les deux renards ayant ingéré 5 campagnols exposés pendant 5 jours seraient probablement morts sans injection d'antidote, et les deux autres renards ayant ingéré une quantité de bromadiolone jusqu'à 2,5 fois plus faible n'ont montré aucun signe extérieur d'intoxication.

L'analyse de bromadiolone dans des fèces de renard est donc possible pour mesurer leur exposition en captivité. Nous devons à présent vérifier si cette méthode est utilisable *in situ*.

## **B. Evaluation de l'exposition des prédateurs par la collecte de fèces et leur dosage en bromadiolone – étude de faisabilité en nature**

Nos recherches se sont orientées vers l'évaluation *in situ* de l'exposition des populations de prédateurs de campagnols à l'aide des marqueurs indirects décrits ci-dessus. L'objectif général était ici de vérifier la faisabilité de collecter des fèces de renards en nature pour y analyser les résidus de bromadiolone dans une zone traitée. Pour cela, deux études ont été réalisées conjointement :

### **1. Etude 1 : Collecte et analyse de fèces de renard en nature**

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que des renards se nourrissant en captivité de campagnols intoxiqués excrétaient de la bromadiolone dans les fèces plusieurs semaines après l'exposition, les résidus étant détectables à de très faibles concentrations grâce à la technique analytique en LC/ESI/MS mise au point. L'étude 1 s'est intéressée à la question suivante :

**Est-il possible de collecter des fèces de renard en nature de façon standardisée dans une zone récemment traitée et d'y détecter de la bromadiolone ?**

#### **1.1 Matériel et méthodes**

##### **1.1.1 Site d'étude**

L'expérimentation a été réalisée au printemps 2007. Deux critères principaux ont guidé le choix de la zone d'étude : (1) réalisation de traitements à la bromadiolone par les agriculteurs sur ce secteur et (2) présence de renards en densité suffisante. Les informations concernant les avis de traitements (FREDON Com pers), les intentions des agriculteurs ainsi que la présence de renards (Comptages nocturnes – Fédération Départementale des Chasseurs du Doubs) ont été confrontées. Peu de traitements étant prévu à cette période, un compromis a été trouvé entre ces deux critères. Ainsi, une zone d'étude de 50 km<sup>2</sup> située sur les communes de Septfontaine, Evillers et Goux-les-Usiers (Doubs) (X 0895940 ; Y 2227825 ; projection Lambert II étendu / NTF) a été sélectionnée. Les traitements à la bromadiolone sur la zone sélectionnée ont eu lieu en majorité entre le 1<sup>er</sup> et le 15 avril 2007.

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

Du fait qu'ils étaient extrêmement ponctuels et dépendants des conditions climatiques, il a été très difficile de les prévoir et de les quantifier mais chacune des parcelles traitées a été répertoriée sur une carte et géo-référencée (Figure 28).

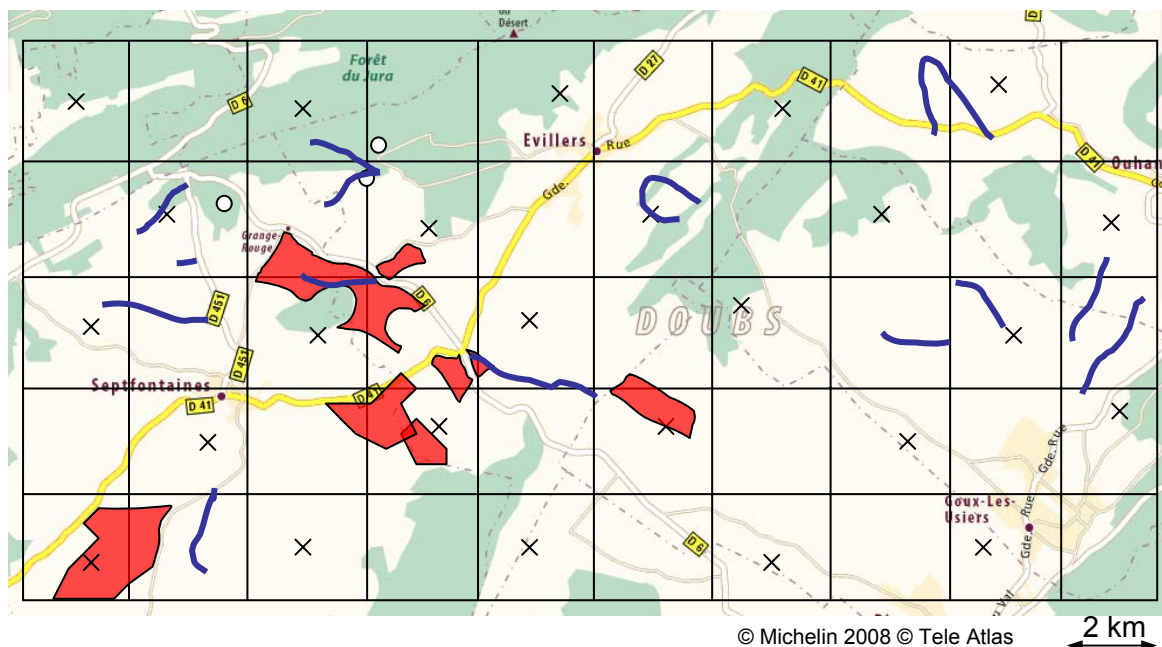


Figure 28. Carte de situation de la zone d'étude. Chaque x symbolise l'emplacement d'un crottoir. Les transects effectués sur les chemins de remembrement sont symbolisés en bleu. Les zones de forêts sont figurées en vert. Les parcelles traitées à la bromadiolone entre le 1er et le 15 avril sont illustrées en rouge. Les terriers de renards qui ont pu être repérés sont représentés par un O.

##### 1.1.2 Collecte de fèces

Ne sachant pas à l'avance si la zone d'étude sélectionnée allait être réellement traitée par les agricultures, pour des problèmes de logistique et notamment la nécessité d'installer des « crottoirs » (voir ci-dessous), la collecte de fèces n'a pas pu commencer dès la réalisation des traitements. L'échantillonnage standardisé de fèces a été réalisé entre le 1<sup>er</sup> et le 30 mai 2007 selon 2 modalités :

**La première partie** des échantillonnages de fèces a été réalisée le long de transects suivant des chemins de remembrement d'après la méthode de collecte de fèces validée par Raoul et al. (2001). Dans la mesure du possible, chaque chemin de remembrement de la zone sélectionnée a été parcouru au moins une fois au cours de cette expérimentation, certains transects ayant été parcourus plusieurs fois.

**La seconde modalité** a eu pour objectif d'optimiser l'échantillonnage en collectant des fèces fraîches plus rapidement que le long de transects et surtout de connaître approximativement la date d'excrétion des fèces collectées. Pour cela, des placettes de défécation (appelées « crottoirs » dans la suite du document) ont été mises en place sur

toute la zone d'étude. Ces crottoirs étaient destinés à attirer les renards pour qu'ils y déposent des excréments afin de marquer leur territoire (Artois 1989). Chaque crottoir consistait en une surface de 1m<sup>2</sup> (1x 1m) dégagée à la bêche et recouverte de 5 cm de sable blanc (sable 0/4 concassé PointP, France). Ils ont été appâtés avec 100 g d'un mélange de steak haché, croquettes et pâtée pour chien. Vingt-cinq crottoirs, chacun espacé l'un de l'autre de 4 km, ont été disposés à proximité du centre d'un carré sur deux d'un quadrillage de maille 2 x 2 km (Figure 28). Ces crottoirs ont été disposés de préférence en dehors de pâtures pour éviter leur piétinement par le bétail et dans des endroits visibles (e.g. fond d'une vaste doline, sommet d'une butte).

La zone d'étude a été divisée en trois parties de surface égale, chacune des zones a été prospectée selon les deux modalités tous les trois jours entre le 15<sup>ème</sup> jour et le 45<sup>ème</sup> jour faisant suite aux traitements à la bromadiolone. Chacune des fèces récoltées a été géoréférencée, l'identification de l'espèce a été basée sur la forme des fèces, leur taille et leur emplacement sur le sol (Raoul et al. 2001). Dans le but d'éviter toute contamination de l'expérimentateur (pathogènes notamment), chacune des fèces a été collectée dans un sac plastique hermétique muni d'un zip puis individualisée. Au laboratoire, une fraction de chacune de ces fèces (environ 0,2 g) a été séparée et disposée dans un tube hermétique contenant de l'alcool absolu (Carlo erba code 308607, Milan, Italie) en vue d'une éventuelle analyse génétique à partir de marqueurs microsatellites de séquences d'ADN<sup>1</sup> (Wandeler et Funk 2006). L'autre fraction a été conservée dans le sac d'origine en vue du dosage. Ces échantillons ont ensuite été congelés à -80°C pendant 3 semaines pour une décontamination d'œufs d'*E. multilocularis* (Raoul et al. 2001) puis ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

##### **1.1.3 Analyse de la bromadiolone**

La bromadiolone a été analysée dans les fèces en LC-MS selon la méthode décrite précédemment (Sage et al. 2008) (Paragraphe IV.A.3.3 p.132). Les limites de détection et de quantification sont respectivement 0,9 et 3,0 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivement. Les concentrations mesurées ont été exprimées en µg de bromadiolone par kg de matière sèche.

---

<sup>1</sup> Les prélèvements sont actuellement conservés à -20°C. Un premier contact avec Mr Guillaume Queney de la société ANTAGENE a été établi en vue d'analyses préliminaires. Dans un premier temps, il sera nécessaire de vérifier si la quantité d'ADN dans les fèces collectées sur le terrain est suffisante. Dans un second temps, nous regarderons si les microsatellites utilisés en routine pour le chien sont envisageables chez le renard et/ou, s'ils conviennent, de valider ceux publiés pour le renard par Wandeler et Funk (2006)

### 1.1.4 Analyses statistiques

Chacune des proportions calculées a été exprimée en pourcentage (e.g. nombre de fèces contenant des résidus de bromadiolone détectables par rapport au nombre total de fèces collectées). L'incertitude sur ces pourcentages dépend du nombre d'individus prélevés et varie donc d'un échantillon à l'autre. Aussi un intervalle de confiance (IC95%) dans lequel la valeur estimée a 95% de chance de se trouver (risque  $\alpha=0,05$ ) a été calculé. La médiane et les quartiles des concentrations mesurées dans chacune des fèces de renard ont été représentés graphiquement par *boxplot* (boîte à moustache).

## 1.2 Résultats

Au cours de cette étude, 65 fèces ont été échantillonnées. Deux fèces d'hermine ont été collectées sur des crotoirs et 63 fèces de différents mammifères ont été collectées le long des transects. Les résultats sont présentés dans la Table 12. La majorité des fèces provient de renards mais des fèces de blaireaux, d'hermines ou de mustélidés dont l'espèce n'a pas pu être déterminée plus précisément ont été aussi collectées. En tout 48% (IC 95% 33,5-62,6) des 48 fèces de renards et 27,3% (IC 95% 7,3-60,6) des fèces d'hermine collectées présentaient des résidus de bromadiolone supérieurs au seuil de quantification de la méthode analytique. Cependant, disposant de peu d'échantillons et la méthode analytique n'étant pas optimisée pour les fèces d'hermine, notre analyse des résultats sera centrée uniquement sur le renard.

Espèces	a) Transects		b) Crotoirs	
	Nb.	Nb. Positif (%) (IC95% )	Nb.	Nb. Positif (%) (IC95% )
Mustélidés sp.	5	0 (0%) (IC95% 0,0-53,7)	0	/
Hermines	9	2 (22%) (IC95% 3,9-59,8)	2	1 (50%) (IC95 9,4-90,5)
Renards	48	23 (48%) (IC95% 33,5-62,6)	0	/
Blaireaux	1	0 (0%) (IC95% 0,0-94,5)	0	/

Table 12. Détail des fèces collectées sur le terrain le long de transects (a) et sur les crotoirs (b).

La Figure 29 représente les résultats de concentrations mesurées dans les fèces de renard présentant des résidus de bromadiolone. Quatre fèces sont beaucoup plus

concentrées que l'ensemble des autres fèces. Les concentrations mesurées vont de 2,1 à 962,1  $\mu\text{g}$  de bromadiolone par kg. La médiane des données est de 13,8  $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ .

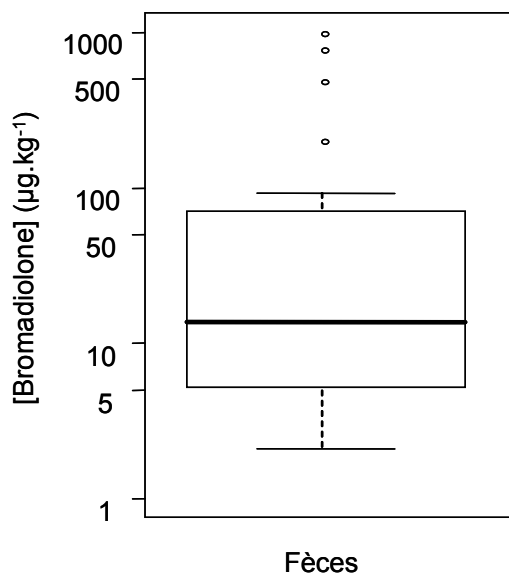


Figure 29. Concentration en bromadiolone (médiane et quartiles) dans les fèces de renard présentant des résidus quantifiables et récoltées sur le terrain entre 15 jours et 45 jours après les traitements. Echelle logarithmique – Résultats exprimés en  $\mu\text{g}$  de bromadiolone par kg de matière sèche.

### 1.3 Discussion

#### 1.3.1 Collecte des fèces

La collecte de fèces sur crottoirs ne semble pas efficace. Pourtant, d'autres scientifiques travaillant sur la collecte de fèces de renard ont déjà utilisé ce mode de collecte (Dr M-L Poulle com. pers.). Dans notre cas, plusieurs optimisations pourraient être apportées en employant par exemple un autre type de sable et en adaptant au mieux l'emplacement de chacun des crottoirs. Dans cette expérimentation, très peu de crottoirs ont pu être disposés de manière visible au milieu des pâtures mais ont plutôt été disposés le long de haies pour éviter d'être piétinés par le bétail.

La collecte de fèces sur transects est plus efficace mais demande beaucoup de temps de prospection. Par contre, par ce 2<sup>nd</sup>e mode de collecte, il est impossible de dater chacune des fèces précisément. Même en cas de prospection d'un même transect à quelques jours d'intervalle, il est difficile de garantir qu'une fèces trouvée lors d'un 2<sup>ème</sup> passage n'a pas échappé à l'observateur lors de la 1<sup>ère</sup> prospection.

### 1.3.2 Résidus de bromadiolone dans les fèces

Notre étude montre qu'il est possible de détecter de la bromadiolone dans des fèces de renard collectées en nature. Les précédents résultats obtenus en captivité (Figure 26 Paragraphe IV.A.4.3 p.139) avaient montré des concentrations maximales le lendemain de la dernière exposition. Elles atteignaient alors en moyenne  $5914 \pm 623 \mu\text{g.kg}^{-1}$  pour les trois renards les plus exposés. Les concentrations mesurées dans notre présente étude sont très inférieures et sont en moyenne 435 fois plus faibles. Par contre, nous rencontrons des concentrations similaires (Mann et Whitney,  $p=0,264$ ) à celles mesurées en captivité entre le 11<sup>ème</sup> et le 23<sup>ème</sup> jour suivant la dernière exposition qui sont comprises entre 1376,5 et 3,7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (médiane =22,6 ; 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles = 16,0 et 37,1). Toutes les fèces présentant des résidus contiennent des quantités de bromadiolone inférieures à 10  $\mu\text{g}$  et présentent des concentrations inférieures à 1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . D'après notre précédente étude en captivité, cela peut correspondre à des fèces de renards actuellement faiblement exposés (cas 2.a. Table 11 p.148) ou alors qui ont été exposés à une quantité de bromadiolone non létale il y a plus de 7-8 jours et qui excrètent des résidus de bromadiolone par voie biliaire (cas 2.b. Table 11 p.148). Quatre des fèces présentent tout de même des concentrations plus élevées par rapport à l'ensemble des données et sont symbolisées en tant que valeurs extrêmes (*outliers*) sur la Figure 29. Il peut dans ce cas s'agir de renards exposés plus récemment ou ayant ingéré une dose de bromadiolone plus importante que les autres.

La comparaison entre le jeu de données de la précédente étude en captivité (Paragraphe IV.A) et celui de cette présente étude *in situ* ne peut être totale puisqu'en captivité, les fèces ont été récoltées quelques heures après leur émission alors que « l'âge » de chacune des fèces collectées en nature sur le transect reste inconnu. La bromadiolone contenue alors dans chacune d'elle a pu être dégradée par photolyse et/ou hydrolyse (Morin, 1988 ; USEPA 1998 ; Kemikalieinspektionen 2006), ou, comme d'autres pesticides dans d'autres matrices biologiques être lessivée ou subir une biotransformation par des microorganismes (Jones et al. 1996).

## 1.4 Conclusion

Nous montrons qu'il est possible de mesurer de la bromadiolone dans des fèces collectées en nature dans une zone traitée. Si prédire la quantité de bromadiolone absorbée par un renard en mesurant les résidus de bromadiolone dans des fèces récoltées en nature semble pour l'instant peu envisageable, le pourcentage de fèces positives collectées dans un secteur, par exemple, pourrait nous permettre de suivre l'exposition d'une population de renards. Nos résultats ouvrent la voie à d'autres études comparant plusieurs situations entre

elles, comme, par exemple, un suivi avant et après les traitements. De manière à connaître l'âge des fèces collectées et diminuer l'influence de la dégradation potentielle de la bromadiolone entre le moment de l'excrétion de la fèces et le moment de sa collecte, la méthode de collecte de fèces sur crottoirs devra être optimisée. Le faible effectif de fèces d'autres espèces collectées nous empêche de discuter d'avantage ces résultats mais le dosage de la molécule dans les fèces d'hermine semble être envisageable. Cependant, avant d'autres expérimentations en nature sur cette espèce, une mise au point de la technique analytique sera nécessaire.

### 1.5 En Bref

48% des fèces de renard collectées en nature entre 15 et 45 jours après un traitement présentent des résidus de bromadiolone quantifiables. Ces concentrations correspondent à celles mesurées en captivité dans des fèces de renards faiblement exposés ou alors exposés à des doses supérieures mais non létales au minimum 7-8 jours auparavant.

L'absence d'information précise sur « l'âge » des fèces collectées ne permet pas d'exclure une dégradation de la molécule et donc une diminution des résidus depuis l'excrétion. La comparaison entre toutes les fèces collectées sur une même zone en un temps donné est de ce fait probablement biaisée.

La collecte de fèces sur crottoirs permettrait d'éliminer ce biais avec des récoltes rapprochées dans le temps mais elle n'est pas optimisée à ce jour.

Les indicateurs tels que le pourcentage de fèces présentant des résidus et/ou les concentrations mesurées dans ces fèces semblent tout de même prometteurs et la prochaine expérimentation devra être menée de manière à déterminer si cette mesure est représentative de l'exposition réelle d'une population de renards.



## **2. Etude 2 : Comparaison des résidus de bromadiolone dans le foie et le contenu rectal de renards prélevés *in situ***

La précédente étude nous a permis de démontrer qu'il était possible de détecter de la bromadiolone dans des fèces de renards collectées en nature dans une zone traitée. Cependant, nous ne savons pas si l'image donnée par cet indicateur (e.g. pourcentage de fèces positives, concentrations en bromadiolone mesurées) est représentative de l'exposition réelle des renards. La seconde étude s'est donc intéressée à la question suivante :

**A l'échelle d'une population de renards, existe-t-il une relation entre la présence de bromadiolone dans le foie (marqueur d'exposition direct) et la présence de bromadiolone dans les fèces (marqueur d'exposition indirect) d'un même individu prélevé *in situ* ? Si oui, une corrélation peut-elle être établie entre la concentration en bromadiolone hépatique et celle mesurée dans les fèces ?**

### **2.1 Matériel et méthode**

Cette étude s'est appuyée sur un programme d'évaluation de la transmission de l'Echinococcose alvéolaire piloté par l'Unité Mixte de Recherche Chrono-Environnement et réalisé en partenariat avec le Laboratoire Vétérinaire Départemental du Doubs (LVD25), l'Entente Rage Zoonose (ERZ Malzéville ; 54) et la Fédération Départementale des Chasseurs du Doubs (FDC25). Un échantillonnage de renards par tirs de nuit a été effectué. Nous avons ainsi pu réaliser des prélèvements de foie et de fèces contenues dans le rectum de renards (échantillons appelés « contenus rectaux » dans la suite du document), en vue d'une analyse de bromadiolone.

#### **2.1.1 Site d'étude et échantillonnage**

Le site d'étude couvrant les cantons de Maîche, Le Russey et Morteau (Doubs) a été traité à la bromadiolone en automne 2006. Des traitements plus ponctuels et localisés ont également été réalisés au printemps 2007<sup>1</sup>. Soixante deux renards ont été prélevés lors de tirs de nuit sur cette zone de 125km<sup>2</sup> entre le 18 mars et le 10 mai 2007. Chaque renard prélevé a ensuite été transféré au LVD25 pour réaliser les prélèvements de foie et de

---

<sup>1</sup> Une évaluation plus précise de ces traitements sera prochainement réalisée grâce aux informations fournies par la FREDON Franche-Comté.

contenu rectal. Chaque foie et environ 5 g de contenus rectaux ont été prélevés sur chacun des renards, congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 3 semaines pour une décontamination d'œufs d'*E. multilocularis* (Raoul et al. 2001) puis ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur analyse.

### **2.1.2 Dosage de la bromadiolone**

Les concentrations en bromadiolone ont été déterminées par HPLC dans le foie d'après la méthode décrite par Sage et al. (2008) et dans les contenus rectaux par LC-MS d'après la méthode décrite dans le paragraphe IV.A.3.3. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,9 et  $3,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , dans les contenus rectaux et de 0,1 et  $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$  dans le foie. Conformément à ces deux études précédentes, les concentrations mesurées dans le foie ont été exprimées en matière fraîche. De manière à s'affranchir de toute variation du taux d'humidité, celles mesurées dans les contenus rectaux ont été exprimées en matière sèche.

### **2.1.3 Analyses statistiques**

La médiane et les quartiles des concentrations ont été calculés. Chacune des proportions a été exprimée en pourcentage (e.g. nombre de foies contenant des résidus de bromadiolone détectables par rapport au nombre total de foies collectés). L'intervalle de confiance de chacun de ces pourcentages (IC95%) a été calculé. La normalité de la distribution des données a été testée en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov. Lorsque la normalité était respectée, ou lorsque les données pouvaient être transformées, une ANOVA a été utilisée pour comparer les concentrations mesurées selon deux modalités différentes (Sokal and Rohlf, 1997). Dans le cas contraire, un test non paramétrique (Kruskal-Wallis ou Wilcoxon) a été employé (Siegel and Castellan, 1988). Deux modèles, un de type linéaire et l'autre de type exponentiel, ont été appliqués sur les données de manière à comparer la relation entre les concentrations mesurées dans les contenus rectaux et celles mesurées dans le foie. Le modèle exprimant au mieux les données a été choisi de façon préliminaire sur la base d'une comparaison de la variance expliquée ( $R^2$ ).

## **2.2 Résultats**

### **2.2.1 Résidus de bromadiolone mesurés dans le foie**

Sur les 62 renards prélevés, 48 foies nous ont été transmis pour analyse. Sept foies (15% IC95% 6,5-28,4) ne présentent aucune trace de bromadiolone, 7 (15% IC95% 6,5-28,4) présentent des résidus détectables mais non quantifiables du fait de leur trop faible

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

concentration et 34 (70% IC95% 55,7-82,6) présentent des concentrations supérieures au seuil de quantification. Au total, 41 renards sur les 48 (85% IC95% 71,6-93,5) présentent des résidus hépatiques au moins détectables (Figure 30).

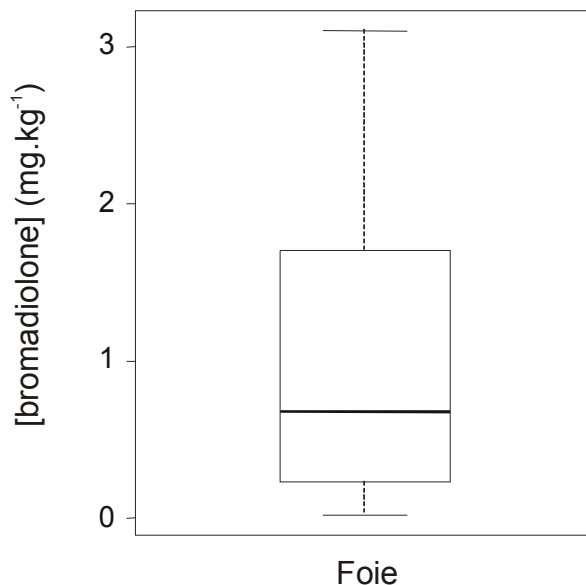


Figure 30. Concentration en bromadiolone (médiane et quartiles) dans les foies de renard prélevés sur le terrain lors de tirs de nuit présentant des résidus de bromadiolone détectables.

#### **2.2.2 Résidus de bromadiolone mesurés dans le contenu rectal**

Sur les 48 contenus rectaux analysés, 34 (71% ; CI95% 55,7-82,6) ne présentent aucune trace de bromadiolone détectable, 2 (4% ; CI95% 0,7-15,4) présentent des résidus détectables mais non quantifiables et 12 (25% ; CI95% 14,1-39,9) présentent des concentrations supérieures au seuil de quantification. Au total, 14 renards sur les 48 (29% ; CI95% 17,4-44,3) présentent des résidus de bromadiolone dans les contenus rectaux. Alors que 75% des données présentant des résidus sont comprises entre 5 et 32  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  avec une valeur médiane de 9,65  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , seul un échantillon présentait une concentration très élevée (577  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) (Figure 31).

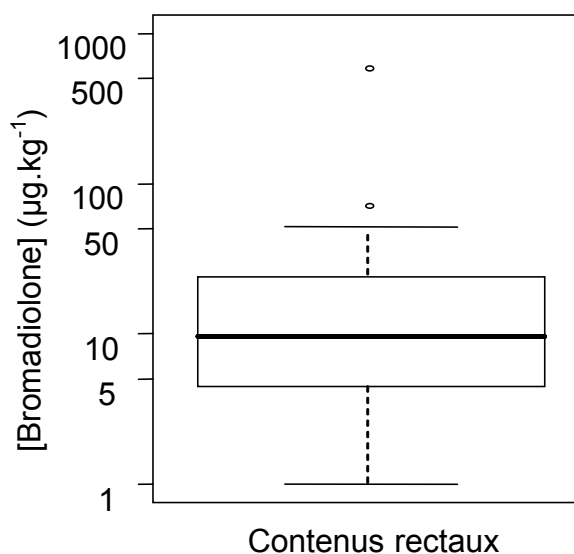


Figure 31. Concentration en bromadiolone (médiane et quartiles) dans les contenus rectaux de renard prélevés sur le terrain lors de tirs de nuit. Echelle logarithmique – Résultats exprimés en  $\mu\text{g}$  de bromadiolone par  $\text{kg}$  de matière sèche.

### **2.2.3 Relations entre résidus hépatiques et résidus mesurés dans les contenus rectaux**

Quatre vingt cinq pour cent (IC95% 71,6-93,5) des renards présentent des résidus hépatiques alors qu'ils sont moins nombreux (29% ; CI95% 17,4-44,3) à présenter des résidus dans leur contenu rectal ( $\text{Khi}^2$ ,  $p < 0.001$ ). La Figure 32 montre une relation exponentielle significative ( $p < 0,05$ ) entre les concentrations mesurées dans les contenus rectaux en fonction de celles mesurées dans les foies de chacun des individus prélevés. Nous remarquerons que lorsque les concentrations mesurées dans le foie sont inférieures à  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$ , le plus souvent, aucun résidu n'est détectable dans le contenu rectal.

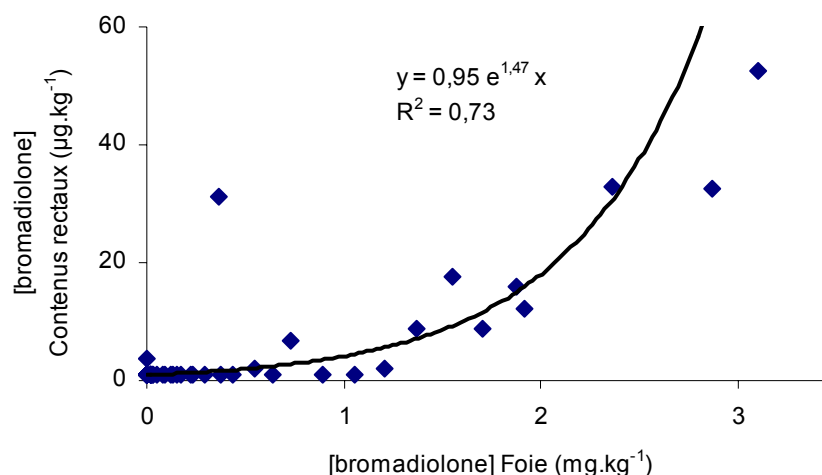


Figure 32. Relation exponentielle entre les concentrations en bromadiolone mesurées dans les fèces (marqueur d'exposition indirect) et dans le foie (marqueur d'exposition direct) des renards. Par souci de lisibilité, un individu présentant des concentrations supérieures (2,5 mg.kg<sup>-1</sup> dans le foie et 577,7 µg.kg<sup>-1</sup> dans le contenu rectal) n'a pas été représenté sur ce graphique.

## 2.3 Discussion

### 2.3.1 Résidus de bromadiolone mesurés dans le foie

Aux vues des résidus mesurés dans leur foie, la majorité (85%) des renards prélevés sur le terrain ont été exposés à la bromadiolone. L'absence de données de persistance à très long terme de la bromadiolone dans le foie de renards (USEPA 1998, AGRITOX INRA 2004) ne nous permet pas de dire si les individus ne présentant aucun résidu détectable dans leur foie n'ont jamais été exposés à de la bromadiolone ou s'ils ont été exposés il y a très longtemps et ont excrété/métabolisé cette bromadiolone depuis.

Les études précédentes rapportant des résidus d'anticoagulant dans les tissus de prédateurs de rongeurs sont basées sur deux modes d'échantillonnage. Certaines, comme notre étude, ont été réalisées sur des animaux prélevés vivants, il est alors possible de comparer nos résultats avec ceux-ci. Par exemple, le taux d'individus présentant des résidus de bromadiolone dans notre étude est très largement supérieur à celui rapporté pour des hermines ou des fouines capturées par des gardes-chasses en Angleterre. McDonald et al. (1998) avaient alors démontré que 23 et 30% de l'une et de l'autre espèce présentaient des résidus d'au moins un des 6 anticoagulants recherchés et 7,5% et 10% présentaient des résidus de bromadiolone, respectivement. Les autres études sont quant à elles le plus souvent basées sur une collecte de cadavres par les réseaux de surveillance et ne sont par conséquent pas représentatives d'un échantillonnage aléatoire (e.g. Shore et al. 2003, Berny et al. 1997,

#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

Barnett et al. 2006). Il nous est de ce fait impossible de comparer le pourcentage d'individus positifs déterminé dans ces études au nôtre.

Les concentrations mesurées dans cette étude (Figure 33.a) sont comparées à celles obtenues lors de la précédente expérimentation d'exposition de renards en condition contrôlée (Figure 33.b) et aux données de Berny et al. (1997) (Figure 33.c) établies sur des cadavres de renards retrouvés morts en nature.

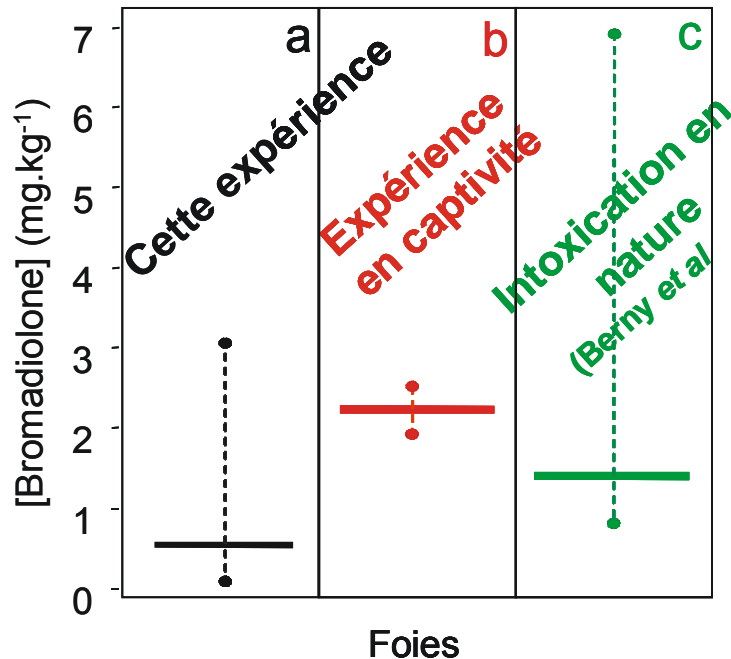


Figure 33. Concentrations en bromadiolone (valeurs médiane, minimum et maximum) mesurées dans les foies des renards prélevés en tir de nuit, n=48 (a), des renards intoxiqués en captivité (Paragraphe IV.A.4.4.4 p.145), n=4 (b) et de renards retrouvés morts sur le terrain à la suite de traitements à la bromadiolone, n=31 (c).

Nous pouvons noter que les résidus hépatiques mesurés sur les renards prélevés dans cette expérience sont pour la plupart inférieurs à ceux mesurés en captivité (Mann et Whitney,  $p=0,018$ ). Cependant, quatre renards sur les 41 positifs (9,75% CI95% 3,2-24,0) présentent des concentrations supérieures à la moyenne des résidus mesurés lors de l'expérience en captivité, sur des renards qui ont présenté de très fortes hémorragies externes (F5.1 et F5.2, Paragraphe IV.A.4.4.3 p.144). Cependant, du fait qu'il nous est impossible de connaître la concentration hépatique effective lorsque ces animaux en captivité présentaient l'état sanitaire le plus critique (Paragraphe IV.A.4.4.4 p.145), nous ne pouvons dire si ces quatre individus prélevés en nature sont actuellement plus exposés que l'ont été les renards de la précédente étude en captivité.

Dans l'étude de Berny et al (1997), seules la médiane et les valeurs minimum et maximum sont rapportées, rendant impossible toute comparaison statistique avec les données de la présente étude. Dans l'étude de Berny et al. (1997), les concentrations

hépatiques ont été obtenues sur des cadavres collectés en nature dont la plupart présentaient des traces d'hémorragies pouvant être la cause de la mort. Dans notre étude, les mesures de résidus hépatiques ont été réalisées sur des renards capturés vivants sur le terrain. L'absence d'information lors de notre expérimentation sur d'éventuelles traces d'hémorragie ne nous permet pas de faire le lien entre les concentrations mesurées dans le foie et les éventuels effets physiologiques sur chacun des animaux. Cependant, depuis l'étude de Berny et al. (1997), les quantités de bromadiolone distribuées par hectare ont été au minimum divisées par 4 par les arrêtés ministériels de 1998 et 2001 (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche 2002). Le fait que certaines de nos valeurs soient supérieures à d'autres de Berny et al. (1997) laisse supposer que, malgré cette diminution de quantité de bromadiolone distribuée, les renards prélevés dans notre présente étude auraient pu présenter de potentiels effets cliniques.

##### **2.3.2 Résidus de bromadiolone mesurés dans le contenu rectal**

Les concentrations mesurées dans les contenus rectaux de cette expérience sont toutes inférieures à  $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  et aucune différence n'a été montrée entre les concentrations mesurées dans les fèces collectées en nature (Paragraphe IV.B.1) et celles de cette présente expérimentation (Mann et Whitney,  $p=0,47$ ). Tout comme les fèces prélevées en nature, et en accord avec notre précédente expérience en captivité, les concentrations mesurées ici peuvent correspondre à des concentrations observées dans des fèces de renards actuellement faiblement exposés (cas 2.a. Table 11) ou alors qui ont été exposés à des quantités de bromadiolone non létales il y a plus de 7-8 jours (cas 2.b. Table 11) mais il nous est impossible de trancher entre l'une ou l'autre de ces possibilités. Certains contenus rectaux témoignent donc d'une exposition plus récente et/ou d'une dose de bromadiolone ingérée plus importante avec notamment une concentration mesurée de  $577 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Contrairement aux expériences précédentes, le calcul de la quantité de bromadiolone présente dans les contenus rectaux n'aurait pas présenté de réelle justification biologique du fait qu'il est impossible de garantir que l'échantillon prélevé correspond à la masse exacte d'une future fèces.

Nous devons préciser que, lors de l'analyse de résidus dans des fèces collectées en nature plusieurs heures ou jours après leur excrétion (Paragraphe IV.B.1), une dégradation de la bromadiolone a pu avoir lieu, soit par photolyse, hydrolyse ou dégradation par des microorganismes (Morin 1988 ; USEPA 1998 ; Kemikalieinspektionen 2006). Les concentrations observées ici dans les contenus rectaux, avant leur émission dans le milieu naturel, sont donc susceptibles d'être supérieures à celles que nous aurions mesurées dans de réelles fèces du même individu.

### **2.3.3 Relation entre résidus hépatiques et concentrations mesurées dans les contenus rectaux**

Nous montrons ici qu'il est possible qu'un renard présente des concentrations hépatiques positives alors qu'aucun résidu n'est détectable dans ses fèces. Pour expliquer ce résultat, l'hypothèse suivante peut être avancée. Il peut s'agir par exemple d'un renard ayant ingéré une quantité de bromadiolone inférieure à la dose létale il y a quelques temps. La bromadiolone s'est accumulée dans son foie mais il n'excrète plus de résidus détectables dans ses fèces. Cette hypothèse est cohérente avec une persistance accrue reportée habituellement dans le foie (USEPA 1998) et une persistance beaucoup moins longue dans les fèces de renard (Paragraphe IV.A). Par ailleurs, lorsque nous constatons des concentrations en bromadiolone dans le foie plus élevées, le renard excrète des quantités détectables dans ses fèces suggérant, par exemple, une exposition plus récente. Ce couplage marqueur direct d'exposition à très long terme (foie) et marqueur indirect d'exposition à moyen terme (fèces) permettrait dans ce cas de donner une idée de l'antériorité de l'exposition.

Il semble impossible de discerner par la simple mesure des résidus de bromadiolone dans les fèces le cas d'un renard actuellement faiblement exposé du cas d'un renard ayant ingéré une dose de bromadiolone quelques jours auparavant plus importante mais non létale. Par contre, un suivi de l'évolution au cours du temps des résidus observés dans les fèces permettrait de mettre en évidence notamment une évolution temporelle de l'exposition, si ce n'est au niveau individuel, tout du moins au niveau populationnel.

## **2.4 Conclusion**

Cette dernière expérimentation a permis de poursuivre la validation *in situ* de la méthode d'évaluation de l'exposition réelle des populations non cibles à l'aide de marqueurs indirects. Nous avons vu qu'une relation d'ordre exponentiel lie les marqueurs d'exposition direct (résidus de bromadiolone dans le foie) et les marqueurs indirects (résidus de bromadiolone dans le contenu rectal). S'il semble pour l'instant peu envisageable de déterminer le degré d'exposition à la bromadiolone de renards au niveau individuel uniquement par dosage de la molécule dans les fèces, il semble tout à fait envisageable d'estimer le degré récent d'exposition d'une population. Nous montrons par exemple dans notre étude que lorsque des résidus de bromadiolone sont détectables dans 29% des contenus rectaux, 85% des renards de cette même population ont été exposés à la bromadiolone. Nous pouvons cependant nous interroger sur ce rapport - nombre de fèces positives / nombre de renards réellement exposés - et notamment sa variabilité en fonction



#### IV. Axe 3 : Comment mesurer l'exposition des populations de renard ?

---

de l'antériorité de l'exposition et des conditions environnementales (paysage, densité de renards, densité de rongeurs et des ressources alimentaires, intensité de traitements...). Par la suite, nous devons notamment déterminer à partir de quel seuil une population de renards encourt un risque avec par exemple comme marqueur le pourcentage de fèces présentant des résidus de bromadiolone et/ou le taux de résidus mesurés dans chacune des fèces et si les facteurs environnementaux décrits précédemment peuvent influencer cette relation.

### 2.5 En bref

Dans la zone d'étude, 85% des renards capturés vivants présentent des résidus de bromadiolone dans leur foie témoignant ainsi d'une exposition réelle des populations largement supérieure à celle qui a pu être déterminée pour d'autres espèces prédatrices de rongeurs dans d'autres pays.

Les concentrations mesurées dans le foie de ces individus sont pour la plupart inférieures à celles mesurées en captivité 23 jours après la dernière exposition. Cependant, 4 foies sur les 41 positifs ont présenté des concentrations supérieures à celles de cadavres de renards retrouvés en nature avec des traces d'hémorragie suggérant que l'intoxication aux anticoagulants était la cause la plus probable de leur mort.

Une relation exponentielle lie les résidus mesurés dans le foie (marqueur d'exposition direct) et ceux mesurés dans le contenu rectal (marqueur d'exposition indirect) d'un même individu et le couplage de ces deux informations pourrait permettre d'avoir une idée de l'antériorité de l'exposition.

Un renard ne montrant plus aucun résidu de bromadiolone détectable dans ses fèces a pu être exposé à des doses qui ne se sont pas avérées létales.

Prédire le niveau d'intoxication au niveau individuel par une simple mesure de la bromadiolone excrétée dans les fèces semble peu envisageable contrairement à une estimation de l'exposition au niveau populationnel.

## **V. DISCUSSION GENERALE**



Les précédents travaux toxicologiques de laboratoire ont montré leur insuffisance dans la prédiction des effets de traitements en grandeur réelle. Réalisés sur des animaux captifs placés dans des conditions proches de la neutralité thermique et sans activité normale (chasse, reproduction...), ils ne prennent pas en compte la variété du régime alimentaire en nature, des comportements spécifiques (stockage des appâts par les campagnols, etc...), la dégradabilité de la molécule, la toxicité de ses métabolites et les échelles spatiales et temporelles auxquelles cette variabilité s'exprime. Les hypothèses portant sur la quantité et la qualité des campagnols consommés par les prédateurs et les résidus de bromadiolone dans les tissus de rongeurs ne sont pas fondées sur une connaissance suffisante de leur biologie (déplacements, stratégies de recherche de nourriture...) et n'intègrent jamais la variabilité de la disponibilité et de l'accessibilité des proies selon les paysages. Pour toutes ces raisons, les résultats toxicologiques des années 80-90 portant sur les effets de la bromadiolone sur différentes espèces n'ont pas permis de prévoir les «dégâts» observés sur la faune non-cible dans les secteurs traités (Giraudoux et Coeurdassier, 2004). Toutefois, le rôle de ces différents facteurs environnementaux et de leurs implications dans le transfert d'un pesticide tel que la bromadiolone dans les réseaux trophiques n'avait jusqu'alors jamais été analysé en détail *in situ*.

### **A. Variabilité environnementale de la persistance de la bromadiolone entre les niveaux trophiques appâts/sols – populations de campagnols de prairie**

Nos travaux ont permis d'améliorer la compréhension du transfert de la bromadiolone dans les réseaux trophiques et son impact sur des vertébrés non-cibles en nature. La Figure 34 synthétise et schématise les facteurs environnementaux pouvant influencer ce transfert. Les paramètres pour lesquels un élément de réponse a été apporté par nos travaux sont présentés dans un cadre. Les données obtenues dans chacune des études ont été indispensables pour établir les protocoles des étapes suivantes afin d'intégrer et de comprendre le transfert, le devenir et les effets de la bromadiolone sur les populations de campagnols puis de prédateurs en fonction des concentrations d'exposition.

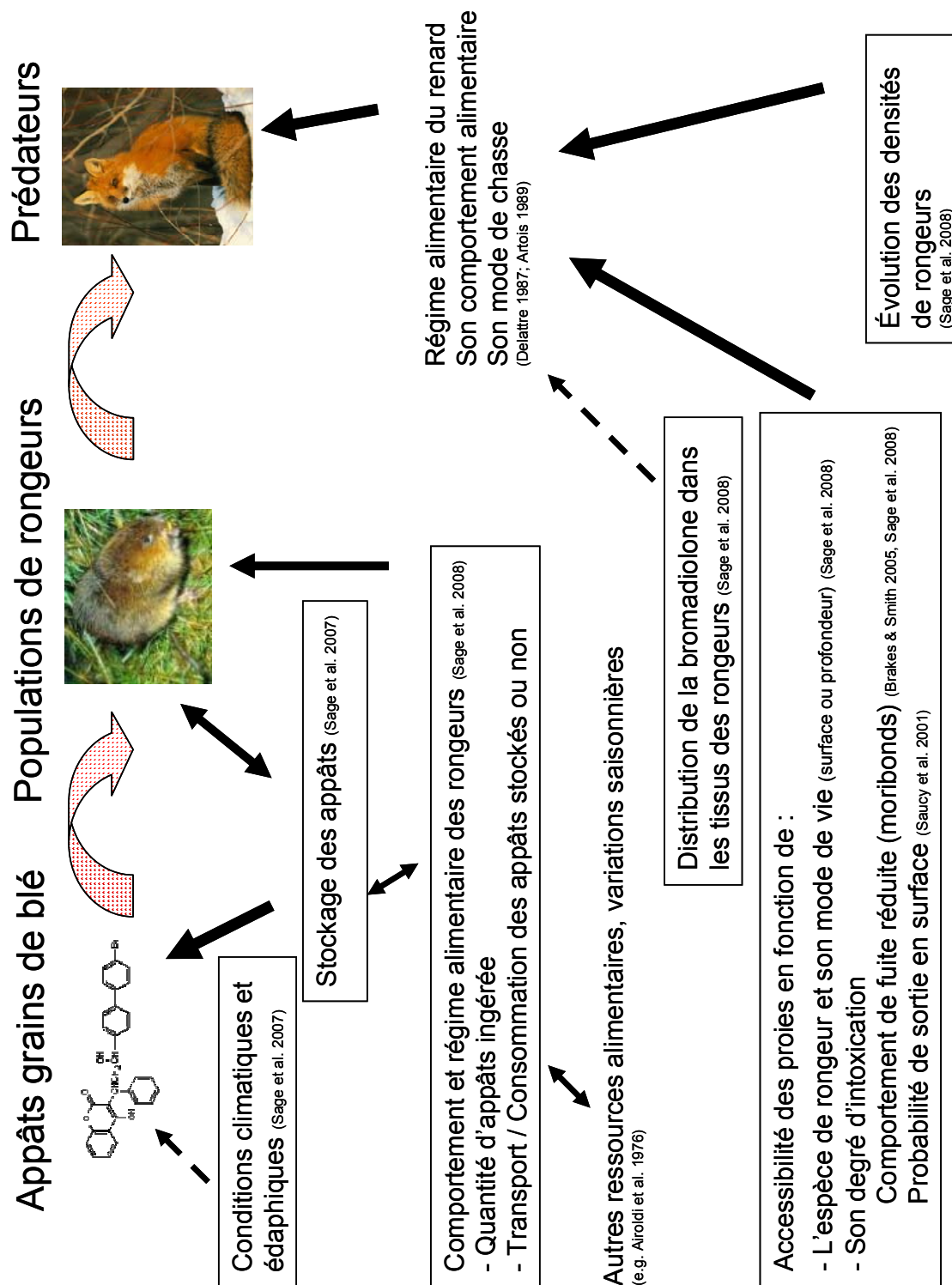


Figure 34. Schéma synthétisant les facteurs environnementaux pouvant moduler le transfert de la bromadiolone dans la chaîne alimentaire « appâts/sols - campagnols de prairie - renard ». Les paramètres pour lesquels un élément de réponse a été apporté par nos travaux sont présentés dans un cadre. Chaque flèche représente proportionnellement à sa taille l'influence que chacun des facteurs exerce sur un autre.

Ces résultats apportent des précisions importantes sur les paramètres des modèles des différents scénari d'expositions directe et indirecte élaborés notamment par Lodal et Hansen (2002) et Giddings et al. (2004) ou Giddings (2006) en vue d'une évaluation du risque. Cependant, la seule connaissance de la persistance de la bromadiolone dans les appâts ou dans les populations de rongeurs n'est pas suffisante pour évaluer le risque d'intoxication secondaire sur le terrain, ce qui doit prendre en compte :

- le comportement complexe des campagnols et de leurs prédateurs qui fait que les interactions appâts/campagnols et campagnols/prédateurs en nature conditionnant l'exposition sont une « boîte noire » difficile à explorer.
- le devenir de la bromadiolone et de ses métabolites dans les différents compartiments des réseaux trophiques impliqués dans le transfert.

Du fait d'une très grande variabilité de ces facteurs et de multiples interactions (Figure 34), nous proposons la mise au point d'une méthode de mesure de l'exposition des populations de renards en nature avec pour objectif d'évaluer les conséquences écologiques des pollutions sur les populations de prédateurs. Il s'agira alors de prévoir les effets potentiels des traitements en s'affranchissant de la compréhension de chacun de ces facteurs. Cette méthode d'évaluation de l'exposition devra permettre à terme de mettre en œuvre des mesures de prévention afin d'éliminer des risques de dommages difficilement réparables *a posteriori*. Par la même occasion, en plus de cette finalité appliquée, il sera alors possible de poursuivre l'étude et la compréhension d'un point de vue fondamentale des différents facteurs modulant cette exposition. Nous pourrons ainsi, de part notre approche intégrée, compléter les connaissances du transfert de la molécule dans la chaîne alimentaire appâts/sols – campagnols de prairie – renards.

## **B. Mesure indirecte de l'exposition des populations de renards**

L'absence d'une méthode de suivi de l'exposition à grande échelle empêchait jusqu'à présent d'évaluer l'impact des traitements sur les populations de renards avant de constater une importante mortalité. Si jusqu'à présent, les seuls marqueurs d'intoxication aux anticoagulants disponibles reposent sur la mesure des concentrations internes (marqueur d'exposition) (Barnett et al., 2006 ; SAGIR 1990-2007) et/ou du temps de coagulation (biomarqueur d'effets) (Mount, 1988), le développement de marqueurs indirects d'exposition au niveau populationnel des vertébrés intoxiqués est de ce fait très novateur.

Une première série d'approche expérimentale de l'étude des effets de la bromadiolone sur le renard a été effectuée en laboratoire, au niveau individuel et ressort intrinsèquement de la toxicologie de l'environnement (Paragraphe IV.A). Basée sur une exposition de renards avec des campagnols présentant des concentrations identiques à celles mesurées dans une population de rongeurs *in situ*, notre étude permet de mieux comprendre les empoisonnements secondaires massifs observés sur le terrain (Berny, 2007 ; SAGIR, 1990-2007). Cette étude a notamment été indispensable à la mise au point d'une méthode analytique permettant de mesurer la bromadiolone excrétée par le renard dans ses fèces et d'établir la relation entre la dose ingérée, les résidus excrétés et les effets cliniques. En complément, nos deux dernières études réalisées *in situ* dans les conditions naturelles propres à la problématique ont permis d'atteindre une représentativité élevée, d'intégrer les paramètres environnementaux et de mener ces expériences sur une fraction étendue d'un écosystème naturel pris dans son intégralité (Paragraphe IV.B) ce qui n'avait jamais été fait auparavant (Grolleau et al., 1989). La poursuite de validation de la collecte en nature et l'analyse de fèces est dès à présent envisageable. Cette méthode non invasive devrait apporter un suivi précoce et permettre de déterminer si une population de renards est exposée à la bromadiolone au moment de la collecte. Elle permet actuellement de déterminer la fréquence d'occurrence de fèces contaminées dans une population de renards à un temps donné. Pour l'instant, il nous est impossible de certifier que l'absence de résidus dans l'ensemble des fèces collectées en nature signifiera que la population de renards n'est pas exposée. Cependant, nous pouvons d'ores et déjà affirmer que si des résidus de bromadiolone sont détectés dans les fèces collectées, les renards présents sur la zone d'étude ont récemment ingéré de la bromadiolone. Dans l'hypothèse qu'aucune dégradation de la molécule ne survient entre l'émission de la fèces et sa collecte (voir précisions page suivante), nous pourrions envisager de mesurer une exposition des renards jusqu'à près de 25 jours après leur dernière ingestion de campagnols intoxiqués.

Cette mesure indirecte de l'exposition est plus facile à mettre en œuvre et aura l'avantage de permettre un *monitoring* avant de constater une mortalité importante (collecte de cadavres de prédateurs) ou des variations de densité populationnelle. Elle devrait permettre :

- d'envisager un suivi de l'évolution de l'exposition d'une même population de renard dans le temps par l'intermédiaire de plusieurs campagnes de collecte à plusieurs semaines d'intervalle,
- de déterminer le niveau d'exposition, tout du moins relatif (% de fèces contaminées et niveau de contamination de chacune d'elles), entre différentes populations.

## C. Perspectives

### 1. Poursuite de la validation de la méthode de mesure de l'exposition des populations de renards

Les différentes études que nous avons pu réaliser au cours de ce travail ont permis de répondre aux objectifs que nous nous étions fixés. Certaines questions ont cependant été soulevées. L'interprétation complète des résultats demandera certaines optimisations. Des investigations supplémentaires devront donc être réalisées et il sera notamment nécessaire de répondre aux deux questions suivantes :

#### 1. Quelle est la persistance de la bromadiolone dans les fèces au cours du temps ?

L'absence d'information précise sur « l'âge » des fèces collectées en nature ne permet pas d'exclure une dégradation de la molécule et donc une diminution des résidus depuis l'excrétion. Le contenu en bromadiolone de chacune d'elles peut diminuer au cours du temps par photolyse et/ou hydrolyse (Kemikalieinspektionen, 2006 ; Morin, 1988 ; USEPA, 1998), ou, comme d'autres pesticides dans d'autres matrices biologiques, être lessivée ou subir une biotransformation par des microorganismes (Jones et al., 1996). S'il semble envisageable de comparer la contamination des fèces collectées dans deux zones distinctes, la comparaison entre toutes les fèces collectées sur une même zone en un temps donné est probablement biaisée puisqu'elles n'ont pas forcément été émises par les renards au même moment. De même un risque de sous-estimation de l'exposition existe puisque qu'il est ainsi possible que des fèces ne présentent plus de résidus de bromadiolone détectables lors de leur collecte alors qu'elles en contenaient lors de leur émission.

Lors de ses travaux de thèse de doctorat, F. Raoul (2001) a tenté de d'estimer l'âge des fèces collectées de façon qualitative : « frais » - « moyen » - « vieux ». Il serait alors pourquoi pas possible de comparer les résidus mesurés dans les différentes catégories. Cependant, à notre sens, cette estimation semble hasardeuse car potentiellement extrêmement dépendante du bol alimentaire du renard. La collecte de fèces sur crottoirs permettrait d'éliminer ce biais avec des récoltes rapprochées dans le temps et permettrait d'envisager de « dater » chacune des fèces. Cependant cette méthode de collecte n'est à ce jour pas optimisée.



### **2. Quelle est la relation reliant l'exposition réelle d'une population de renards et la mesure de son exposition par le dosage de la bromadiolone dans les fèces ?**

Il est probablement tolérable de retrouver de la bromadiolone dans les fèces de renard collectées en nature. Cependant, il reste à établir à partir de quel seuil critique un risque important est avéré pour la population (% de fèces présentant des résidus de bromadiolone et/ou le taux de résidus de bromadiolone mesuré dans chacune des fèces).

Pour cela, il sera nécessaire de déterminer dans une même zone quelle relation il existe en un temps donné entre :

- la mesure indirecte de l'exposition (résidus de bromadiolone mesurés dans les fèces collectées en nature),
- la mesure directe de l'exposition de la population de renards (% de renards prélevés en tirs de nuit présentant des résidus de bromadiolone dans le foie, les quantités de résidus mesurées, la présence éventuelle d'hémorragies ou d'autres signes cliniques)
- l'impact réel sur les populations de renards à travers la mortalité constatée sur le terrain (nombre de cadavres collectés et cause suspectée de leur mort).

Jusqu'à présent une concentration hépatique  $\geq 0,2$  mg de bromadiolone par kg était considérée comme une évidence d'intoxication cliniquement significative (Barnett et al., 2006 ; Berny et al., 1997). En cela nos études, dans un premier temps en captivité (Paragraphe IV.A) et dans un second temps sur le terrain (Paragraphe IV.B), vont nous aider à faire le lien entre la quantité de résidus mesurées dans le foie, les hémorragies observées et la cause de mortalité imputable à une intoxication à la bromadiolone. La comparaison entre les données déjà acquises et celles-ci devrait alors permettre de mieux comprendre et interpréter les causes de mortalité imputées aux animaux collectés par les réseaux de surveillance de type SAGIR ou W/S

### **2. Pour une compréhension plus fine des processus de transfert**

La réponse à trois autres questions supplémentaires permettra une meilleure compréhension de la mesure de l'exposition des prédateurs et de la cinétique d'intoxication à très long terme des rongeurs suite à un traitement.

**1. Dans une fèces, une faible quantité de bromadiolone reflète-t-elle une exposition ancienne et non létale ou alors une exposition plus récente mais faible ?**

Nous l'avons vu en introduction générale (Paragraphe I.C.3.7.2), une exposition à la bromadiolone en continu peut s'avérer létale à de très faibles doses (Kemikalieinspektionen, 2006). Pour cela, une exposition ponctuelle à une quantité non létale de bromadiolone n'aura pas le même impact sur un animal qu'une exposition continue à cette même quantité. Actuellement, il nous est impossible de détecter l'une ou l'autre de ces deux situations par le simple dosage de la molécule mère dans une fèces.

Chez le renard, nous avons montré qu'il était possible de détecter des résidus de la molécule-mère jusqu'à au moins 23 jours après l'exposition. Chez le rat, il a été montré que la majorité de la bromadiolone (22% de la dose ingérée) était retrouvée sous forme non métabolisée dans ses fèces mais que 15% était sous forme d'un métabolite majeur (Kemikalieinspektionen, 2006). Nous ne savons pas si ce rapport molécule-mère/métabolite(s) primaire et secondaire excrété dans les fèces varie au cours du temps. Nous pouvons supposer par exemple que ce rapport va évoluer en fonction de la fraction de bromadiolone qui n'est pas bioaccessible pour l'organisme et qui a simplement transité dans le tube digestif des animaux sans être réellement absorbée (e.g. Dean et Ma, 2007). Si tel est le cas, nous pourrions envisager d'établir cette relation. Il serait alors possible en mesurant ce rapport molécule-mère/métabolite(s) primaire et secondaire excrété, de déterminer à quand remonte la dernière ingestion de bromadiolone. Ceci pourrait être notamment envisageable en optimisant la méthode analytique LC-MS actuellement mise au point en LC-MSn de manière à identifier et quantifier les métabolites de la bromadiolone.

**2. Est-ce que plusieurs fèces collectées dans une même zone appartiennent à un seul et même renard ou à plusieurs ?**

Nous pouvons supposer qu'à un temps donné, la probabilité de collecter une fèces, qu'elle ait été émise par un renard exposé ou un renard sain, est identique. S'il nous est possible de connaître le pourcentage de fèces collectées présentant des résidus de bromadiolone détectables, il nous est impossible d'avancer une taille de la population et donc un nombre de renards exposés. Il apparaît de ce fait pertinent de déterminer si toutes les fèces collectées appartiennent à un seul et même individu ou à plusieurs. La mesure par exemple d'un Indice Kilométrique (*IK*) en répertoriant le nombre de renards observés sur une zone donnée permettrait de connaître la densité relative de renards sur cette zone et de

supposer que l'ensemble des fèces collectées est représentatif de l'ensemble des renards présents sur la zone.

Dans le cas d'un suivi temporel d'une même zone, il apparaît intéressant de déterminer si les fèces positives échantillonnées lors de la seconde collecte appartiennent aux mêmes individus que les fèces positives échantillonnées lors de la première collecte.

Si par exemple tel est le cas, et si le rapport fèces positives/fèces négatives reste inchangé, l'exposition de la population est restée constante entre ces deux collectes. Les individus qui étaient exposés lors de la première collecte le sont toujours. Leur risque d'ingérer une dose létale lors d'une exposition continue est donc plus élevé. Par contre dans ce cas, il n'y a pas eu de nouveaux individus exposés entre les deux collectes.

Si au contraire de nouveaux individus présentent des résidus dans leurs fèces alors que le rapport fèces positives/fèces négatives reste inchangé, nous pourrions supposer que l'exposition de la population de renards a évolué entre ces deux campagnes de collecte. Deux hypothèses non exclusives peuvent alors être avancées :

- Ces individus étaient déjà présents lors de la première collecte mais aucune de leurs fèces n'avait montré de résidus alors que pendant ce temps-là, les individus qui étaient exposés lors de la première collecte ne le sont plus.

- Ces individus n'étaient pas présents lors de la première collecte et aucune de leurs fèces n'avait été collectée. Nous pouvons alors supposer qu'il s'agit d'individus migrants venus occuper les territoires libérés par la mort des individus qui étaient déjà exposés lors de la première collecte. Ainsi, ni le pourcentage de fèces positives collectées, ni le nombre de fèces positives n'a changé. Pourtant, de plus en plus de renards sont exposés et encourent un risque d'empoisonnement. Il est donc de ce fait pertinent de suivre l'évolution de densité des renards sur un même secteur mais aussi de réaliser des recherches d'éventuels cadavres.

Dans le cas où plusieurs fèces d'un même individu ont été collectées à plusieurs jours/semaines d'intervalle, nous pourrions aussi envisager un suivi individuel dans le temps et envisager de déterminer le risque qu'il encourt en fonction de la durée pendant laquelle il est exposé.

Ceci pourrait être réalisable notamment par marquage moléculaire utilisé par exemple en biologie de la conservation grâce à la signature génétique individuelle de chacune des fèces (Kohn et Wayn, 1997 ; Taberlet et al., 2001 ; Wandeler et al., 2006). Le matériel biologique disponible lors de l'échantillonnage non invasif d'excréments présente de sérieuses limitations en raison des faibles quantités d'ADN disponibles et du risque d'erreur de typage associé (Taberlet et al., 1996). En effet, les échantillons ont souvent subi l'action

de dégradation induite par les contraintes environnementales. Les variations de températures entre le passage de l'animal et le jour où l'échantillon est collecté peuvent provoquer la lyse (éclatement) des cellules ; le contenu cellulaire, dont l'ADN, est alors exposé aux agressions du milieu extérieur. Il subit des lessivages par la pluie, des attaques enzymatiques de la part d'organismes décomposeurs (champignons, bactéries) et est bombardé de radiations solaires (UV). Tous ces facteurs concourent à altérer la qualité de l'ADN ou à le dégrader pour partie (Taberlet et al., 1996). Pour pallier ces contraintes, les conditions de conservations doivent être scrupuleusement respectées. Les échantillons prélevés lors de la collecte de fèces en nature (Paragraphe IV.B.1) et conservés à -20°C dans de l'alcool absolu permettront d'envisager très prochainement de déterminer quels microsattellites pourront être identifiés et sélectionnés pour permettre cette individualisation génétique.

### **3. L'apparition de résistance chez les rongeurs pourrait-elle impliquer une exposition accrue pour les prédateurs ?**

La recolonisation des parcelles traitées par les rongeurs avoisinants une parcelle traitée est susceptible d'expliquer en partie le fait que les prédateurs puissent consommer des campagnols intoxiqués pendant 4 voir 6 mois après un traitement (Paragraphe III.A et III.B). Cependant, l'apparition d'une résistance, ou tout du moins d'une baisse de sensibilité, développée parmi les individus cibles peut être un facteur important concernant le risque d'exposition secondaire. Les individus cibles sont susceptibles d'accumuler ces molécules et d'augmenter ainsi les résidus disponibles pour leurs prédateurs. A ce jour très peu de données sont disponibles sur ce sujet dans la littérature. Seul Atterby et al. (2005) ont montré une accumulation de difenacoum chez les rats résistants légèrement supérieure à celle observée chez les individus sensibles mais qu'il était peu probable que ceci représente un risque significativement plus élevé pour les prédateurs. Par contre le risque viendrait majoritairement d'une prolongation du temps de survie des rongeurs et donc d'une exposition accrue des prédateurs dans le temps. Qu'il s'agisse de rodenticides anticoagulants ou de tout autre pesticide, le principal problème d'apparition d'une résistance dans une population cible est qu'elle implique une application de matière active beaucoup plus importante en quantité et nécessite l'utilisation de molécules de plus en plus toxiques. Ainsi, différentes évaluations montrent une augmentation de l'exposition indirecte d'espèces non cibles lorsque les anticoagulants sont utilisés contre des populations de rongeurs résistants (Kemikalieinspektionen 2006 ; Shore et Barnett, 2001).

Ce phénomène de résistance a été découvert très rapidement, à la suite des premières grandes opérations de dératisation et d'hygiène dans les grandes villes d'Europe, chez le Rat surmulot (*Rattus norvegicus*) (Boyle, 1960) ou la Souris domestique (*Mus musculus*

*domesticus*) (Dodsworth, 1961 in Pelz et al., 2005). Une enquête réalisée dans 30 départements français montre qu'environ 40% des rats portent des mutations sur le gène VKORC1 impliquées dans la résistance et que 28% des individus présentent la seule mutation Y139F qui est clairement causale d'une forme de résistance (Grandemange et al., 2007). De même, la prévalence de rats résistants dans une population échantillonnée en Grande-Bretagne est portée à 40 – 45% (Prescott et Greaves, 1999). Cependant à ce jour, très peu de données sont disponibles sur les rongeurs de prairie. Une étude exploratoire récente (Vein et al., 2007) a fourni une première indication sur l'intérêt de prendre en compte le phénomène de résistance dans la mise en place des stratégies de contrôle en plein champ, notamment dans le cas d'exposition prolongée de prédateurs se nourrissant de campagnols intoxiqués. Cette étude a montré que les traitements réguliers des prairies par la bromadiolone ont entraîné des phénomènes qui peuvent être reliés à une résistance du Campagnol terrestre aux anticoagulants mais qui restent à mieux identifier.

### D. Conclusion

La description et la compréhension du transfert de la bromadiolone à travers les niveaux trophiques, associées à une approche de modélisation, ont permis d'envisager une méthode de mesure de l'exposition du renard *in situ* dans le but d'établir un outil d'évaluation des risques d'empoisonnement d'espèces vertébrées non-cibles. Nos travaux permettent la prise en compte des processus écologiques qui s'effectuent dans un fragment d'écosystème ou dans un écosystème pris dans son ensemble et d'intégrer la réponse du système écologique donné aux variations des conditions environnementales. D'une manière plus générale, ces travaux apportent des connaissances sur les processus de transfert de pesticides en nature en intégrant des niveaux de perception écologique (individu, population, communauté) et permettront d'aborder différentes méthodologies d'études (suivi de populations, analyses spatiale et paysagère) qui font souvent défaut dans les études écotoxicologiques. Il sera alors possible d'intégrer le concept d'échelle, tant au plan de la dimension spatiale que temporelle qui occupe une place essentielle, tant en écologie qu'en écotoxicologie (Smith et al., 2007 ; Newton, 2001, Ricklefs, et Miller 1999). L'approche retenue permettra ainsi d'étudier la contamination de l'environnement, le comportement et les effets des polluants ainsi que les conséquences écologiques qui en découlent à des échelles spatiales et temporelles importantes.

## Vers une mise en place d'un système de mesure de l'exposition des populations de renards suite aux traitements.

Ces travaux apportent des connaissances nouvelles d'aide à la décision tout en rendant possible les améliorations nécessaires des opérations de contrôle des pullulations de campagnols, notamment des luttes chimiques intégrées. Au terme de ces études, nous devrions pouvoir répondre aux objectifs suivants qui viseront à évaluer en nature l'exposition réelle des populations non cibles à l'aide de marqueurs indirects n'impliquant ni la mort ni la capture de l'animal.

Tout comme nous avons pu le faire pour les compartiments « appâts » et « campagnols de prairie », puisqu'il nous sera rendu possible de mesurer l'exposition des populations de renards en nature, nous pourrions alors déterminer si différents facteurs environnementaux peuvent moduler cette exposition et notamment déterminer l'influence :

1. de la structure du paysage sur cette exposition (pourcentage de prairie permanentes, situation de la zone d'étude (plateaux inférieurs, plateaux supérieurs, hautes chaînes)). Ces données sont notamment connues pour influencer les densités de rongeurs (Delattre et al., 1999c; Delattre et al., 1992; Duhamel et al., 2000; Fichet-Calvet et al., 2000; Giraudoux et al., 1997; Raoul et al., 2001) et de ce fait les relations proies-prédateurs.
2. des densités de renards (évolution des Indices Kilométriques (*IK*) et des densités relatives interannuelles). Les densités de renards sont notamment connues comme dépendantes du paysage, des pratiques agricoles, de la saison et de la disponibilité en proies (Artois 1989).
3. des densités de rongeurs, la structure de leur peuplement et du suivi de leur contamination (estimation des densités relatives par la méthode développée par Giraudoux et al. (1995), présence d'autres espèces de rongeurs sur les zones traitées, suivi de leur contamination (Sage et al. 2008)).
4. des pratiques agricoles (cultures céréalières, labour, prairie de fauche ou de pâture...) qui conditionnent l'évolution des densités de rongeurs (Morilhat et al. 2007) ainsi que les relations proies/prédateurs sans oublier les méthodes de lutte (physiques, biologiques ou chimiques) et leur intensité (date des traitements, quantité distribuée par hectare, distribution dite « en plein » ou « au terrier », méthodes alternatives... (FREDON Franche-Comté et al., 2006).

L'étude de ces différents facteurs pouvant contrôler l'exposition du renard *in situ* permettra d'envisager un modèle d'évaluation du risque écotoxicologique pour les populations. La superposition des différentes couches d'observation (Figure 35) sera alors intégrable dans un Système d'Information Géographique (SIG). Il sera alors pourquoi pas possible de prévoir avant tout traitement l'exposition potentielle des prédateurs en fonction de ces différents paramètres.

Ces études devraient permettre de s'orienter plus précisément vers une évaluation du risque (« *risk assessment* ») pour la santé des écosystèmes et la mise au point de méthodes de protection environnementale plus efficaces. Nous pourrions ainsi fournir aux administrations et à la profession agricole un cadre de connaissances permettant de fonder une lutte raisonnée basée sur de nouveaux modes de gestion de la bromadiolone. En prenant en compte l'efficacité des modes de traitements et les niveaux d'exposition des populations de prédateurs mesurés par cette méthode indirecte et non invasive, ces données pourront aider à faire évoluer les traitements à la bromadiolone vers des pratiques présentant des expositions les plus faibles et sans risque pour les prédateurs.

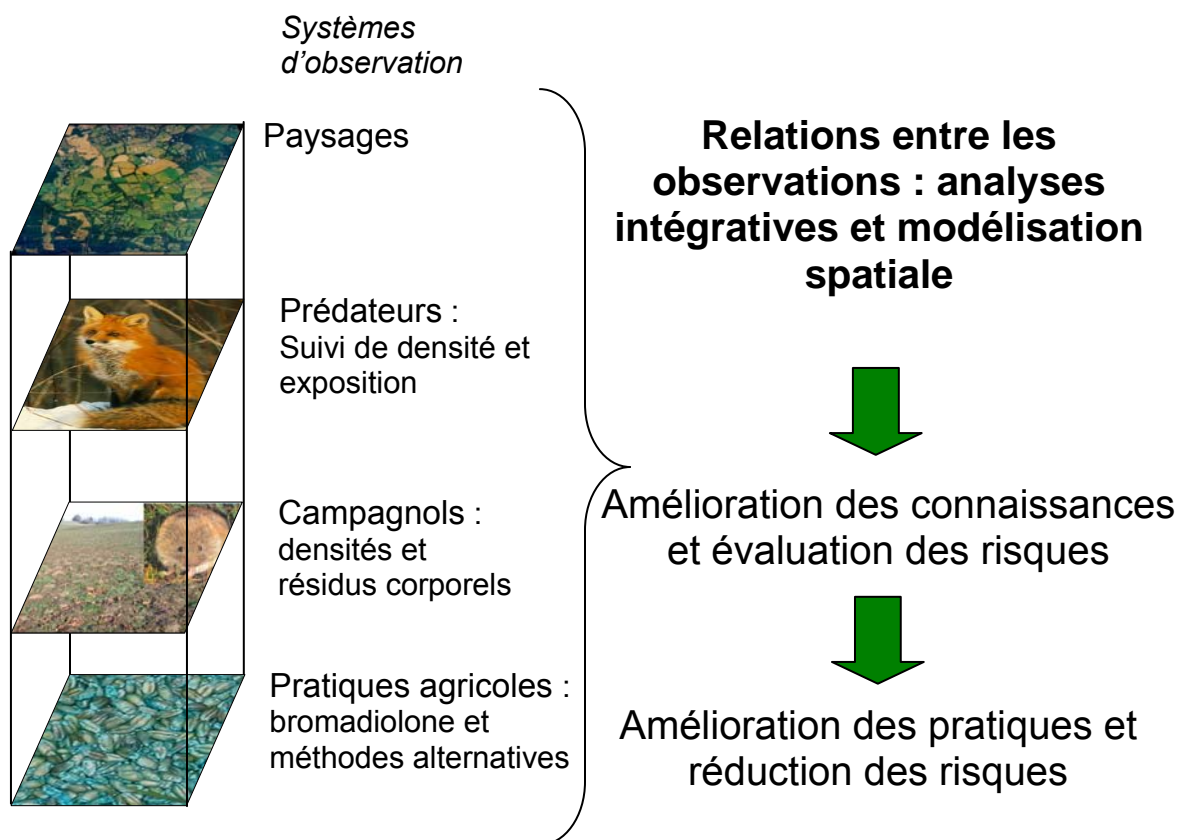


Figure 35. Schéma représentant un modèle du système envisagé, l'approche proposée et les résultats attendus (d'après Cœurdaissier et al. 2005).

Le contrôle des populations de rongeurs et les intoxications de la faune non cibles constituent un problème majeur dans de nombreux pays et notamment en Indonésie pour la protection des cultures de canne à sucre et de palmier à huile (Lasseur com. pers.). Des essais internes ont d'ores et déjà montré qu'il était possible de mesurer des résidus de bromadiolone dans les fèces d'hermine notamment (Paragraphe IV.B.1), et de collecter de façon standardisée des pelotes de buse variable (*Buteo buteo*) en nature (Fritsh 2006). Cette nouvelle approche pourrait de ce fait être retenue pour envisager la mesure de l'exposition d'autres espèces prédatrices que le renard à d'autres anticoagulants rodenticides dans un tout autre contexte.





## **VI. Références bibliographiques**



- AFNOR, 1994. Évaluation de la qualité des sols - Volume 1 : méthodes d'analyse chimique - Volume 2 : méthodes d'analyses physique et biologique. Paris, France.
- AGRITOX INRA, 2004. Fiche d'information sur les substances actives phytopharmaceutiques - Bromadiolone / Lipha. <http://www.inra.fr/aritox>. 2004.
- Airoldi, J.P., 1976. The burrow system of the fossorial form of the water vole, *Arvicola terrestris scherman Shaw (Mammalia, Rodentia)*. Sonderdruck aus Z. Säugetierkunde f. Säugetierkunde Bd. 41, 23-42.
- Airoldi, J.P., Altrocchi, R., Meylan, A., 1976. The burrowing behavior of the water vole, *Arvicola terrestris scherman Shaw (Mammalia, Rodentia)*. Revue Suisse de Zoologie. 83, 282-286.
- Alterio, N., 1996. Secondary poisoning of stoats (*Mustela erminea*), feral ferrets (*Mustela furo*), and feral house cats (*Felis catus*) by the anticoagulant poison, brodifacoum. New Zealand Journal of Zoology. 23, 331-338.
- Alterio, N., Brown, K. P., Moller, H., 1997. Secondary poisoning of mustelids in a new Zealand *Northfagus* forest. Journal of Zoology (London). 243, 863-869.
- Amiard, J.C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.-C. & Ramade F. (eds), Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier Tec & Doc, Paris, XXI-XXXI.
- Anderson, D.R., Link, W.A., Johnson, D.H., Burnham, K.P., 2001. Suggestions for presenting the results of data analyses. Journal of wildlife management. 65 (3), 373-378.
- Armstrong, S.A., Van de Wiele, T., Germida, J.J., Siciliano, S.D., 2007. Aryl hydrocarbon bioaccessibility to small mammals from arctic plants using in vitro techniques. Environmental Toxicology and Chemistry. 26, 491-496.
- Artois, M., 1989. Le Renard roux (*Vulpes vulpes Linnaeus, 1758*). In: M. Artois, P. Delattre, Eds.), Encyclopédie des carnivores de France, SFEPM, Nort/Erdre, pp. 90
- Atterby, H., Kelly, M.J., MacNicoll, A.D., 1999. Difenacoum resistance in rats is not a consequence of increased metabolism and excretion. Second European Vertebrate Pest Management Conference. Braunschweig, Germany.
- Atterby, H., Kerins, G.M., MacNicoll, A.D., 2005. Whole-carcass residues of the rodenticide difenacoum in anticoagulant-resistant and -susceptible rat strains (*Rattus norvegicus*). Environmental Toxicology and Chemistry. 24, 318-323.
- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., M. Voltz (éditeurs), 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et CEMAGREF (France).
- Baerson, S.R., Rodriguez, D.J., Tran, M., Feng, Y., Biest, N.A., Dill, G.M., 2002. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Plant physiology. 129, 1265-1275.
- Baize, D., Girard, M.C., 1998. A sound reference base for soils the référentiel pédologique. INRA ed, Versailles, France.
- Barnett, E.A., Fletcher, M., Hunter, K., Taylor, M.J., Sharp, A.E., 2006. Pesticide poisoning of animals in 2006 - Investigations of suspected incidents in the United Kingdom. A report of the Environmental Panel of the Advisory Committee on Pesticides 2007, London: Defra.
- Batten, P., Bratt, H., 1990. Brodifacoum: Elimination From the Tissues of Rats Following Administration of Single Oral Doses: Lab Project Number: UR0172: UR0211: CTL/P/1559. Unpublished study prepared by ICI Central Toxicology Laboratory. 65 pp.

## VI. Références bibliographiques

---

- Beklova, M., Krizkova, S., Supalkova, V., Mikelova, R., Adam, V., Pikula, J., Kizek, R., 2007. Determination of bromadiolone in pheasants and foxes by differential pulse voltametry. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*. 87, 459-469.
- Benachour, N., Moslemi, S., Sipahutar, H., Seralini, G.-E., 2007. Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222, 129-140.
- Berg, H., Kiibus, M., Kautsky, N., 1992. DDT and others insecticides in the lake Kariba ecosystem, Zimbabwe, *Ambio*. 21, 444-450.
- Bernillon, P., Bois, F.Y., 2000. Statistical issues in toxicokinetic modeling: a bayesian perspective. *Environ Health Perspectives*. 108, Suppl 5, 883-893.
- Berny, P., 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 30, 93-100.
- Berny, P., Buronfosse, T., Lorgue, G., 1995. Anticoagulant poisoning in animals: a simple new High-Performance Thin-Layer Chromatographic (HPTLC) method for simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides in liver samples. *Journal of Analytical Toxicology*. 19, 576-580.
- Berny, P.J., Buronfosse, T., Buronfosse, F., Lamarque, F., Lorgue, G., 1997. Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*. 35, 1817-1829.
- Berny, P., Gaillet, J.R., 2008. Acute poisoning of Red Kites (*Milvus milvus*) in France: Data from the SAGIR network. *Journal of Wildlife Diseases*. 44, 417-426.
- Berny, P., de-Oliveira, L., Videmann, B., Rossi, S., 2006. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *American Journal of Veterinary Research*. 67, 363-371.
- Berthier, K., Galan, M., Foltête, J.C., Charbonnel, N., Cosson, J.F., 2005. Genetic structure of the cyclic fossorial water vole (*Arvicola terrestris*): landscape and demographic influences. *Molecular Ecology*. 14, 2861-2871.
- Binev, R., Petkov, P., Rusenov, A., 2005. Intoxication with anticoagulant rodenticide bromadiolone in a dog - a case report. *Veterinarski Arhiv*. 75, 273-282.
- Boatman, N.D., Brickle, N.W., Hart, J.D., Milson, T.P., Morris, A.J., Murray, A.W.A., Murray, K.A., Robertson, P.A., 2004. Evidence for the indirect effects of pesticides on farmland birds. *Ibis*. 146, 131-143.
- Boermans, H.J., Johnstone, I., Black, W.D., Murphy, M., 1991. Clinical signs, laboratory changes and toxicokinetics of brodifacoum in the horse. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 55, 11-27.
- Boesten, J., Linden, A.V., 1991. Modeling the influence of sorption and transformation on pesticides leaching and persistence. *Journal of Environmental Quality*. 20, 425-435.
- Boschetti, E., Molho, D., Chabert, J., Grand, M., Fontaine, L., 1972. Nouvelles coumarines à activité anticoagulante. *Chimica Therapeutica*. 1, 20-23.
- Bouwer, H., 1986. Intake rate: cylinder infiltrometer. In: *Methods of soil analysis, part 1. Physical and mineralogical methods. Agronomy monograph n°9 (2nd ed.)*. Am. Soc. of Agronomy, Soil Science Society of America Journal.
- Boyle, C., 1960. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature*. 188, 517-525.
- 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, 118-128.

- Brown, K.P., Alterio, N., Moller, H., 1998. Secondary poisoning of stoats (*Mustela erminea*) at low mouse (*Mus musculus*) abundance in a New Zealand *Nothofagus* forest. *Wildlife Research*. 25, 419-426.
- Bruckert, S., Gaiffe, M., 1985. Les sols de Franche-Comté. CUER, Besançon, France.
- Burnham, K.P. & Anderson, D.R., 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach (2nd ed.). Springer-Verlag, New York.
- Calow, P., 1996. Ecology in ecotoxicology : some possible rule of thumbs. In : Baird D.J. Maltby L. Graig-Smith PW., Douben PET. *Ecotoxicology: Ecological dimension*, Chapman and Hall, London, 5-12
- Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Conséquences d'atteintes individuelles précoces sur la dynamique des populations et la structuration des communautés et des écosystèmes. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. & Ramade F. (Eds.). *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 265-298.
- Centre de documentation Économie-Finances, 2008. Reach : un nouveau dispositif de contrôle des substances chimiques.  
[http://www.minefe.gouv.fr/directions\\_services/cedef/synthese/reach/synthese.htm](http://www.minefe.gouv.fr/directions_services/cedef/synthese/reach/synthese.htm)
- Coetzeen, M., van Wyk, P., Booman, M., Koekemoer, L.L., Hunt, R.H., 2006. Insecticide resistance in malaria vector mosquitoes in a gold mining town in Ghana and implications for malaria control. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*. 99, 400-403.
- Cœurdassier, M., Sage, M., Giraudoux, P. 2005 Comité Régional Campagnols – Laviron (Doubs, France) 16 octobre 2005.
- Commission des Communautés Européennes, 2001. Livre Blanc – Stratégie pour la future politique dans le domaine des substances chimiques. 27-2-2001. Bruxelles, Belgique. 35pp.
- Cox, P., Smith, R.H., 1992. Rodenticide ecotoxicology: Pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. In: Borrecco JE, Marsh RE, editors. *Proceedings of the 15th Vertebrate Pest Conference*. University of Nebraska; Lincoln: Printed at Univ. of California.
- de Snoo, G.R., Scheiddegger, N.M.I., de Jong, F.M.W., 1999. Vertebrate wildlife incidents with pesticides: a European survey. *Pesticide Science*. 55, 47-54
- de Vries, J.X., Schmitz-Kummer, E., 1994. Determination of the coumarin anticoagulant phenprocoumon and metabolites in human plasma, urine and breast milk by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography. B Biomedical Applications*. 655, 63–71.
- Dean, J.R., Ma, R., 2007. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. *Chemosphere*. 68, 1399-1407.
- Delattre, P., 1997. La belette et l'hermine. In: Artois M, Delattre P, editors. *Encyclopédie des carnivores de France*, SFEPM, Nort/Erdre, 73.
- Delattre, P., 2002. Les causes des pullulations : bilan des connaissances scientifiques, solutions et voies de recherche. In *Colloque Prairies d'altitude et pullulations de campagnols, pratiques de lutte et enjeux environnementaux*. (Préfecture, U et CR Franche-Comté), Besançon (25), France.
- Delattre, P., Chaste, B., & Silvy, C. 1999a. Lutte biologique et rongeurs. *Les Dossiers de l'Environnement de l'INRA*, 19.
- Delattre, P., Quere, J.P., Giraudoux, P., Grolleau, G., Habert, M., & Truchetet, D., 1999b. Lutte chimique et rongeurs. *Le Courrier de l'Environnement de l'INRA*, 36.

## VI. Références bibliographiques

---

- Delattre, P., De Sousa, B., Fichet, E., Quere, J. P., Giraudoux, P., 1999c. Vole outbreaks in a landscape context: evidence from a six year study of *Microtus arvalis*. *Landscape Ecology*. 14, 401-412.
- Delattre, P., Duplantier, J.M., Fichet-Calvet, E., Giraudoux, P., 1998. Pullulation de rongeurs, agriculture et santé publique. *Cahier Agricultures*. 7, 285-298.
- Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Quere, J.P., Fichet, E., 1996. Effect of landscape structure on Common Vole (*Microtus arvalis*) distribution and abundance at several space scales. *Landscape Ecology*. 11, 279-288.
- Delattre, P., Giraudoux, P., Baudry, J., Truchetet, D., Musard, P., Toussaint, M., Stahl, P., et al., 1992. Land use patterns and types of common vole (*Microtus arvalis*) population kinetics. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 39, 153-169.
- Delley, B., Joseph, E., 1985. Prévention des pullulations de campagnols terrestres en prairie de montagne - acquis récents et perspectives de développement d'appâts rodenticides. *Recherche agronomique en Suisse*. 24, 121-178.
- Deepa, S., Mishra, A.K., 2005. Fluorescence spectroscopic study of serum albumin-bromadiolone interaction: fluorimetric determination of bromadiolone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 38, 556-563.
- Dowding, J.E., Murphy, E.C., Veitch, C.R., 1999. Brodifacoum residues in target and non-target species following an aerial poisoning operation on motuihe island, Hauraki gulf, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology*. 23, 207-214.
- Duhamel, R., Quere, J.P., Delattre, P., Giraudoux, P., 2000. Landscape effects on the population dynamics of the fossorial form of the water vole (*Arvicola terrestris sherman*). *Landscape Ecology*. 15, 89-98.
- Eadsforth, C.V., Dutton, A.J., Harrison, E.G., 1991. A Barn owl feeding study with [<sup>14</sup>C] flocoumafen-dosed mice : validation of a non-invasive methode of monitoring exposure of Barn Owls to anticoagulant rodenticides in their prey. *Pesticide Science*. 32, 105-119.
- Eason, C.T., O'Halloran, K., 2002. Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology*. 181-182, 517-521.
- Eason, C.T., Murphy, E.C., Wright, G.R.G., Spurr, E.B., 2002. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zeland. *Ecotoxicology*. 11, 35-48.
- Eason, C.T., Milne, L., Potts, M., Morriss, G., Wright, G.R.G., Sutherland, O.R.W., 1999. Secondary and tertiary poisoning risks associated with brodifacoum. *New Zealand Journal of Ecology*. 23, 219-224.
- Eason, C.T., Spurr, E.B., 1995. Review of the toxicity and impacts of brodifacoum on non-target wildlife in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*. 22, 371-379.
- Eason, C.T., Wright, G.R.G., Batcheler, D., 1996. Anticoagulant effects and the persistence of brodifacoum in possums (*Trichosurus vulpecula*). *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 39, 397-400.
- EPA, 1998. Registration Eligibility Decision (RED) Rodenticide Cluster. EPA 738-R-98-007. Environmental Protection Agency, United States  
<http://www.epa.gov/pesticides/registration/status.htm>
- EPA, 2002. Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mammals: a Comparative Approach. Environmental Protection Agency, United States.  
<http://www.epa.gov/pesticides/registration/status.htm>
- Erickson, W., Urban, D., 2002. Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mammals: a Comparative Approach. Vol. 1. United States Environmental Protection Agency, Washington DC., pp. 198 pp.

- European Commission, 2002. Guidance document on risk assessment for birds and mammals under council directive 91/414/EEC - Working document. Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, 44pp. + appendix.
- Evans, J., Ward, L., 1967. Secondary poisoning associated with anticoagulant-killed nutria. American Veterinary Medicine Association. 15, 1, 856-861
- FAO, 2002. Département de l'agriculture – Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture – Sommet mondial de l'alimentation, cinq ans après 12-13 juin 2002. 2pp.
- FAO, 2005. Adaptation to climate change in agriculture, forestry and fisheries: Perspective, framework and priorities. Food and agriculture organization of the United Nations. Rome, Italie, 32 pp.
- Fauconnet, V., Pouliquen, H., Pinault, L., 1997. Reversed-phase HPLC determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver. Journal of Analytical Toxicology. 21, 548–553.
- Feng, S.Z., Zhou, H.Z., Li, Y.L., Wang, F.L., Sun, J., Liu, Y., 1999. SPE analysis of 4 rodenticides in whole blood and liver by HPLC. Fa Yi Xue Za Zhi. 15, 21–22.
- Fichet-Calvet, E., Pradier, B., Quere, J.P., Giraudoux, P., Delattre, P., 2000. Landscape composition and vole outbreaks: evidence from an eight year study of *Arvicola terrestris scherman*. Ecography. 23 (6), 659–668.
- Fisher, P., 1999. Review of using Rhodamine B as a marker for wildlife studies. Wildlife Society Bulletin. 27, 318-329.
- Fisher, P., O'Connor, C., Wright, G., Eason, C.T., 2004, Anticoagulant residues in rats and secondary non-target risk, Doc Science Internal Series.
- Font, G., Manes, J., Molto, J.C., Pico, Y., 1993. Solid-phase extraction in multi-residues pesticide analysis of water. Journal of Chromatography A. 642, 135-161.
- Fournier-Chambrillon, C., Berny, P., Coiffier, O., Barbedienne, P., Dassé, B., Delas, G., Galineau, H., et al., 2004. Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implication for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). Journal of Wildlife Diseases. 40, 688-695.
- FREDON Franche-Comté, DRAF Franche-Comté, Université de Franche-Comté, DIREN Franche-Comté, INRA, 2006. Le Campagnol terrestre en Franche-Comté, 2000-2006 : de la lutte chimique... à la lutte raisonnée. 36pp.
- Fritsh, C., 2006. Evaluation de l'exposition des rapaces à la bromadiolone par l'échantillonnage de pelotes de régurgitation – Etude de faisabilité. UMR Chrono Environnement. Nov. Dec. 2005. 31pp.
- Fritschy, J.M., Meylan, A., 1980. Occupation d'un même terrier par *Talpa europea* L. et *Arvicola terrestris scherman* (Shaw) (*Mammalia*). Revue suisse Zool. 87, 895-906.
- Furie, B., Furie, B.C., 1990. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. Blood. 9, 1753-1762.
- Giddings, J., Warren-Hicks, W., Mortensen, S., Edwards, P., Hosmer, A., 2005. A probabilistic model of rodenticide exposure to non-target predators and scavengers. 15th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology & Chemistry Europe; 22 - 26 may 2005, Lille, France.
- Giddings, J., Warren-Hicks, W., Edwards, P., 2006. Knowledge gaps in rodenticide risk assessment as revealed by probabilistic modelling. First International Workshop on the Environmental Impacts of Second-Generation Rodenticides, 10 November 2006, Montréal, Canada.



## VI. Références bibliographiques

---

- Giraudoux, P., & Coeurdassier, M., 2004. Dossier de candidature d'un boursier de thèse INRA Oct 2004.
- Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quere, J.P., et al., 2003. Interaction between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology*. 127, 121-131.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Habert, M., Quere, J.P., Deblay, S., Defaut, R., Duhamel, R., et al., 1997. Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris scherman*): a land usage and landscape perspective. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 66, 47-60.
- Giraudoux, P., Pradier, B., Delattre, P., Deblay, S., Salvi, D., Defaut, R., 1995. Estimation of water vole abundance by using surface indices. *Acta Theriologica*. 40, 77-96.
- Giraudoux, P., Tremolières, C., Barbier, B., Defaut, R., Rieffel, D., Bernard, N., Lucot, E., et al., 2006. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environmental Research*. 102, 291-298.
- Grafen, A., & Hails, R., 2002. *Modern statistics for the life sciences*. Oxford University Press, New York.
- Grand, M., 1976. Données expérimentales sur un nouveau raticide anticoagulant : le bromadiolone. *Phytiatrie-Phytopharmacie*. 25, 69-88.
- Grandemange, A., Lasseur, R., Berny, P., Benoit, E., 2007. Spread of resistance to anticoagulant rodenticides in *Rattus norvegicus*. VI<sup>th</sup> European Vertebrate pest Conference, 11-15 septembre 2007, Reading, UK.
- Gray, A., Eadsforth, C.V., Dutton, A.J., 1994. Non-invasive methode for monitoring the exposure of Barn Owls to second-generation rodenticides. *Pesticide Science*. 41, 339-343.
- Grobosch, T., Angelow, B., Schonberg, L., Lampe, D., 2006. Acute bromadiolone intoxication. *Journal of Analytical Toxicology*. 30, 281-286.
- Grolleau, G., 1983. Le rodenticide anticoagulant bromadiolone est-il dangereux pour les animaux prédateurs et en particulier les rapaces? *La Défense des Végétaux*. 219, 14-22.
- Grolleau, G., 1996. Toxicité secondaire, pour la buse variable - *Buteo buteo*, de l'anticoagulant bromadiolone ingéré par des campagnols terrestres, *Arvicola terrestris*, sous forme d'un appât blé à 50 ppm. Laboratoire de Phytopharmacie, Unité d'Eco-étho-toxicologie, INRA, route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex (France). Unpublished
- Grolleau, G., 1997. Diminution possible du risque d'intoxication secondaire pour la Buse variable (*Buteo buteo*), modèle pour les rapaces prédateurs de rongeurs, par utilisation d'un appât blé à 50 ppm de bromadiolone pour la lutte contre le Campagnol terrestre (*Arvicola terrestris*). Laboratoire de Phytopharmacie, Unité d'Eco-étho-toxicologie, INRA, route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex (France). Unpublished. pp. 4.
- Grolleau, G., 1998. Evaluation du risque de toxicité secondaire, pour la buse variable (*Buteo buteo*), liée à l'utilisation d'un appât blé à 50 ppm de bromadiolone pour la lutte contre le Campagnol terrestre. Laboratoire de Phytopharmacie, Unité d'Eco-étho-toxicologie, INRA, route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex (France). Unpublished. 2 pp.
- Grolleau, G., Lorgue, G., Nahas, K., 1989. Toxicité secondaire, en laboratoire, d'un rodenticide anticoagulant (bromadiolone) pour des prédateurs de rongeurs champêtres: Buse variable (*Buteo buteo*) et Hermine (*Mustela erminea*). *Bulletin OEPP/EPPO*. 19, 633-648.
- Guan, F., Ishii, A., Seno, H., Watanabe, K., Kumazawa, T., Suzuki, O. 1999. A method for simultaneous determination of five anticoagulant rodenticides in whole blood by high-

- performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 21, 179–185.
- Gustafson, D.I., Holden, L.R., 1990. Nonlinear pesticide dissipation in soil: A new model based on spatial variability. *Environmental Science & Technology*. 24 (7), 1032-1038.
- Hawkins, D., Brodie, R., Clarke, D., 1991. Determination of the Residues and the Half-Life of the Rodenticides Brodifacoum, Bromadiolone, and Flocoumafen in the Livers of Rats During 200 Days after a Single Oral Dose of Each at a Dose Level of 0.2 mg/kg. Lab Project Number: HRC/LPA 158/891590. Unpublished study prepared by Huntingdon Research Centre. 78.
- Hegdal, P.L., Colvin, B.A., 1988. Potential hazard to eastern screech-owls and other raptors of brodifacoum bait used for vole control in orchards. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 7, 245-260.
- Himel, C.M., Loats, H., Bailey, G.W., 1990. Pesticide sources to the soil and principles of spray physics. In: *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling*. 2, Soil Sci. Soc. Am. Book Series
- Hoffman, H., Fent, G., Kubiak, R., 2003. A new test system for investigation of short-range-non-target deposition of volatilised pesticides. In: E.C. Attilio Amerigo Maria Del Re, Laura Padovani, Marco Trevisan (Editor), XII Symposium on Pesticide Chemistry, Piacenza, Italy, pp. 83-88.
- Hollinger, B.R., Pastoor, T.P., 1993. Case management and plasma halflife in a case of brodifacoum poisoning. *Archives of internal medicine*. 153, 1925–1928.
- Houin, R., Deniau, M., Liance, M., Puel, F., 1982. *Arvicola terrestris* an intermediate host of *Echinococcus multilocularis* in France: Epidemiological consequences. *International Journal For Parasitology*. 12, 593-600.
- Howald, G.R., Mineau, P., Elliott, J.E., Cheng, K.M., 1999. Brodifacoum Poisoning of Avian Scavengers During Rat Control on a Seabird Colony. *Ecotoxicology*. 8, 431-447.
- Huguet, X., 1998. Intoxication par la bromadiolone. Etude épidémiologique et clinique d'après les données du C.N.I.T.V Lyon et du laboratoire de toxicologie de l'E.N.V.L de 1991 à 1996. *Thèse de doctorat vétérinaire*. Université Claude Bernard, Lyon, 111 pp.
- Hunter, K., 1983a. Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. I. Fluorescence detection using post-column techniques. *Journal of Chromatography*. 270, 267-276.
- Hunter, K., 1983b. Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. II. Fluorescence detection using ion-pair chromatography. *Journal of Chromatography*. 270, 277-283.
- Hunter, K., 1985. High-performance liquid chromatographic strategies for the determination and confirmation of anticoagulant rodenticide residues in animal tissues. *Journal of Chromatography A*. 321, 255-272.
- Hunter, K., Sharp, E. A., Newton, A., 1988. Determination of diastereoisomers of bromadiolone, an anticouglant rodenticide, in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 435, 83-95.
- IFEN, 2006. Les pesticides dans les eaux – Données 2003 et 2004 – Rapport de l'Institut Français de l'Environnement n°5 Aout 2006. 40 pp.
- IPCS INCHEM, 1995. International programme on chemical safety, anticoagulant rodenticides. *Environmental Health Criteria* 175, Geneva. [www.inchem.org](http://www.inchem.org)
- ISSS-ISRIC-FAO, 1998. World reference base for soil resources. *World Soil Resources Reports* N° 84. FAO. Rome, Italy.

## VI. Références bibliographiques

---

- Jain, N.C., 1993. Essentials of veterinary hematology. Lea et Febiger, Philadelphia, 417 pp.
- Janova, E., Heroldova, M., Nesvadbova, J., Bryja, J., Tkadlec, E., 2003. Age variation in a fluctuating population of the common vole. *Oecologia*. 137, 527-532.
- Jin, M.C., Ren, Y.P., Xu, X.M., Chen, X.H., 2007. Determination of bromadiolone in whole blood by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Forensic Science International*. 171, 52-56.
- Johnstone, I.B., 1988. Clinical and laboratory diagnosis of bleeding disorders. In: Feldman BF. Ed. *The veterinary clinics of North America: small animal practice*. Philadelphia: WB Saunders. 21-33.
- Jones, K.C., Alcock, R.E., Johnson, D.L., Nothcott, G.L., Semple, K.T., Woolgar, P.J., 1996. Organic chemicals in contaminated land: analysis significance and research priorities. *Land Contamination and Reclamation*. 3, 189-197.
- Julliard, R., Leirs, H., Stenseth, N.C., Yoccoz, N.G., Prévot-Julliard, A.C., Verhagen, R., Verheyen, W., 1999. Survival-variation within and between functional categories of the African multimammate rat. *Journal of Animal Ecology*. 68, 550-561.
- Kelly, M.J., Chambers, J., MacNicoll, A.D., 1993. Simple and rapid method for the determination of the diastereomers of difenacoum in blood and liver using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of chromatography. Biomedical applications*. 620, 105-112.
- Kemikalieinspektionen, S.C.I., 2006. Competent authority report according to directive 98/8/EC Bromadiolone Cas 28772-56-7; Sweden.
- Kendall, R.J., Lacher, T.E., 1994. *Wildlife Toxicology and Population Modeling—Integrated Studies of Agroecosystems*. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, USA.
- Koeman, J.H., Oskamp, A.A.G., Veen, J., 1967. Insecticide as a factor of mortality in Sandwich tern (*Sterna sandvicensis*): a preliminary communication. *Med. Rijks. Landbouw., Wet. Gent*, XXXXII, 3, 841-854.
- Kohn, M.H. & Wayne R.K. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in ecology & evolution*. 12, 223-227.
- Kolf-Clauw, M., Alvarez, E., Matray, O., 1995. Anticoagulant rodenticides : étiologie, diagnostic et traitement des intoxications. *Recueil de Medecine Vétérinaire. Spécial toxicologie des carnivores domestiques*, 127-134.
- Kollrose, J., Schober, C., 2002. Determination of coumarin-type anticoagulants in human plasma by HPLC-electrospray ionisation tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *Clinical Chemistry*. 48, 84-91.
- Kuijpers, E.A., den Hartigh, J., Savelkoul, T.J., de Wolff F.A., 1995. A method for the simultaneous identification and quantitation of five superwarfarin rodenticides in human serum. *Journal of Analytical Toxicology*. 19, 557-562.
- Kupper, J., Grobosch, T., Kistler, R., Sydler, T., Naegeli, H., 2006. Bromadiolone poisoning in foxes. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*. 148, 405-408.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux. Masson Paris France.
- Lambert, O., Pouliquen, H., Larhantec, M., Thorin, C., L'Hostis, M., 2007. Exposure of raptors and waterbirds to anticoagulant rodenticides (Difenacoum, bromadiolone, coumatetralyl, coumaten, brodifacoum): Epidemiological survey in loire atlantique (France). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 79, 91-94.

- Larocque, M., Banton, O., Lafrange, P., 1998. Simulation par le modèle AgriFlux du devenir de l'atrazine et du dééthylatrazine dans un sol du Québec sous maïs sucré. *Revue des sciences de l'eau*. 11, 191-208.
- Le Bonniec, B., 2004. La cible de la warfarine identifiée. *M/S : Médecine Science* 20, 512-514.
- Lebreton, J.D., Burnham, K.P., Clobert, J., Anderson, D.R., 1992. Modelling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological Monographs*. 62, 67-118.
- Le Louarn, H., Quere, J.P., 2003. *Les Rongeurs de France : Faunistique et Biologie*. Paris, France.
- Lewis, J.H., 1996. *Comparative hemostasis in vertebrates*. Plenum press. New York and London
- Lin, P.J., Jin, D.Y., Tie, J.K., Presnell, S.R., Straight, D.L., Stafford, D.W., 2002. The Putative Vitamin K-dependent gamma -Glutamyl Carboxylase Internal Propeptide Appears to Be the Propeptide Binding Site. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 28584-28591.
- Linder, M., 2001. Genetic mechanisms for hypersensitivity and resistance to the anticoagulant warfarin. *Clinica Chimica Acta*. 308, 1-2, 9-15.
- Lipha, 1982. The metabolism of <sup>14</sup>C-LM 637 in the rat and its binding to rat plasma proteins. Non-public. Laboratory report no. LPA 41/81587 GLP/Unpublished
- Lipha, 1987. Kinetics of Bromadiolone, anticoagulant rodenticide, in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). ENVL – INRA, France. The Italian Pharmacological Society, Pharmacological research Communications Vol 19 No. 11, 767-775. Non GLP/Published
- Lipha, 1991. Determination of the residues and the half-life of the rodenticides Brodifacoum, Bromadiolone and Flocoumafen in the livers of rats during 200 days after a single oral dose of each at a dose level of 0.2 mg/kg. Non-public. Laboratory report no. LPA 158/891590 GLP/Unpublished
- Lodal, J., Hansen, O.C., 2002. Human and environmental exposure scenarios for rodenticides – focus on the Nordic Countries. In: TemaNord, (Ed.), Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 181pp.
- Lorgue, G., Mally, C., Nahas, K., 1985. Traitement de l'intoxication par la bromadiolone, rodenticide anticoagulant, chez le chien. *Recueil de Médecine vétérinaire*. 161, 329-334.
- Löschnig, J., Schechner, K., 1911. *Die Wühlmaus: ihre Lebensweise und Bekämpfung*. Herausgeg. v. Landesobstbauverein Niederösterreich, Wien.
- Lund, M., Rasmussen, A.M., 1986. Secondary poisoning hazard to stone martens (*Martes foina*) fed bromadiolone-poisoned mice. *Nordik Veterinary-Medicine*. 38, 241-243.
- Ma, G.L., Gan, J., Papiernik, S.K., Becker, J.O., Yates, S.R., 2001. Degradation of soil fumigants as affected by initial concentration and temperature. *Journal of Environmental Quality*. 30, 1278-1286.
- Mackay, D., 2001. *Multimedia environmental models: The fugacity approach*. (2e Ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Marek, L.J., Koskinen, W.C., 2007. Multiresidue Analysis of Seven Anticoagulant Rodenticides by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray/Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55, 571-576.
- Marsh, R.E., 1977. Bromadiolone, a new anticoagulant rodenticide. *EPPO Bulletin*. 7 (2), 495-502.

## VI. Références bibliographiques

---

- Martinet, L., 1996. Détermination de l'âge chez le campagnol des champs (*Microtus arvalis Pallas*) par la pesée du cristallin. *Mammalia*. 30, 425-430.
- Maurer, H.H., Arlt, J.W., 1998. Detection of 4-hydroxycoumarin anticoagulants and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas chromatography-mass spectrometry after extractive methylation. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 714, 181-195.
- McDonald, R.A., Harris, S., Turnbull, G., Brown, P., Fletcher, M., 1998. Anticoagulant rodenticides in stoats (*Mustela erminea*) and weasels (*Mustela nivalis*) in England. *Environmental Pollution*. 103, 17-23.
- McLaughling, A., Mineau, P., 1995. The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 55, 201-212.
- Meiser, H., 2005. Detection of anticoagulant residues by a new HPLC method in specimens of poisoned animals and a poison control case study. *Journal of analytical toxicology*. 29, 556-563.
- Meylan, A., Höhn, H., 1991. Taupe et Campagnol terrestre. *Revue suisse de viticulture, arboriculture et horticulture*. Vol. 1, pp. 2.
- Merson, M.H., Byers, R.E., Kaukeinen, D.E., 1984. Residues of the rodenticide brodifacoum in voles and raptors after orchard treatment. *Journal of Wildlife Management*. 48, 212-216.
- Miller, D.R., 1978. Models for total transport. In: Butler G.C., (Ed.), *Principle of Ecotoxicology*, John Wiley & Sons, New York and Chichester, 71-90.
- Mineau, P., 2002. Estimating the probability of bird mortality from pesticide sprays on the basis of the field study record. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1497-1506.
- Mineau, P., Fletcher, M.R., Glazer, L.C., Thomas, N.J., Brassard, C., Wilson, L.K., Elliott, J.E., Lyon, L.A., Henny, C.J., Bollinger, T., Porter, S.L., 1999. Poisoning of raptors with organophosphorous and carbamates pesticides with emphasis on Canada, U.S. and U.K. *Journal of Raptor Research*. 33(1), 1-37.
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2002. Arrêté ministériel du 17 décembre 2001 relatif aux conditions d'emploi de la bromadiolone pour la lutte contre le Campagnol terrestre. J.O. n° 25 du 30 janvier 2002, p. 2015.
- Ministère de l'Agriculture et de la pêche, 2008. Ecophyto 2018. [www.agriculture.gouv.fr](http://www.agriculture.gouv.fr).
- Misra, B., 1995. Aerobic Soil Metabolism of Bromadiolone: Amended Final Report: Lab Project Number : ME 9200154. Unpublished study prepared by Pittsburgh Environmental Research Lab, Inc., 106pp.
- Mitchell-Jones, A.J.J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Krystufek, B., Reijnders, P., Spitzenberger, P., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohralik, V., Zima, J., 1999. *The Atlas of European Mammals* Publisher: Poyser, T. & A. D. Limited for the Societas Europaea Mammalogica ISBN-13: 9780856611308. 484pp.
- Moriarty, F., 1999. *Ecotoxicology, the study of pollutants in ecosystems*, Third Edition Academic Press, London, UK.
- Morilhat, C., Bernard, N., Bournais, C., Meyer, C., Lamboley, C., Giraudoux, P., 2007. Responses of *Arvicola terrestris scherman* populations to agricultural practices, and to *Talpa europaea* abundance in eastern France. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 122, 392-398.
- Morin, M.F., 1988. Etude de l'impact sur le milieu naturel de la bromadiolone, rodenticide anticoagulant : Evolution en milieu aqueux et bioaccumulation sur des organismes terrestres et aquatiques. Thèse de doctorat, Université de Poitiers. 129pp.

- Morriss, G.A., Nugent, G., Fisher, P., 2005. Exposure of feral pigs to brodifacoum following baiting for rodent control. Doc Science Internal Series. 194, 1-16.
- Mount, M.E., 1988. Diagnosis and therapy of anticoagulant rodenticide intoxicants. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice. 18, 115-130.
- Mount, M.E., Feldman, B.F., 1982. Vitamin K and its therapeutic importance. Journal of the American Veterinary Medical Association. 11, 1354-1356
- Mount, M.E., Kass, P.H., 1989. Diagnostic importance of vitamin K1 and its epoxide measured in serum of dogs exposed to an anticoagulant rodenticide. American Journal of Veterinary Research. 50, 1704-1709.
- Mount, M.E., Kim, B.U., Kass, P.H., 2003. Use of a test for proteins induced by vitamin K absence or antagonism in diagnosis of anticoagulant poisoning in dogs: 325 cases (1987-1997). Journal of the American Veterinary Medical Association. 222, 194-198.
- Murphy, E.C., Clapperton, B.K., Bradfield, P.M.F., Speed, H.J., 1998. Brodifacoum residues in target and non-target animals following large-scale poison operations in New Zealand podocarp-hardwood forests. New Zealand Journal of Zoology. 25, 307-314.
- Nahas, K., 1986. Dosage de la bromadiolone (rodenticide anticoagulant) dans le plasma, le foie et le rein du rat. Journal of Chromatography. 369, 445-448.
- Nahas, K., 1987. Kinetics of bromadiolone, anticoagulant rodenticide, in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). Pharmacological Research Communications. 19, 767-775.
- Naidong, W., Ring, R.R., Midtlien, C., Jiang, X., 2001. Development and validation of a sensitive and robust LC-tandem MS method for the analysis of warfarin enantiomers in human plasma. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 25, 219-226.
- Newman, M.C., 2001. Population ecotoxicology. John Wiley & Sons Canada, Toronto.
- Newton, I., Wyllie, I., Asher, A., 1993. Long-term trends in organochlorine and mercury residues in some predatory birds in Britain. Environmental Pollution. 79, 143-151.
- Newton, I., Wyllie, I., Gray, A., Eadsforth, C.V., 1994. The Toxicity of the Rodenticide Flocoumafen to Barn Owls and Its Elimination via Pellets. Pesticide science. 41, 187-193.
- O'Bryan, S.M., Constable, D.J. 1991. Quantification of brodifacoum in plasma and liver tissue by HPLC. Journal of analytical toxicology. 15, 144-147.
- O'Connor, J., 1948. The use of blood anticoagulants for rodent control. Research. 1, 334-336.
- OCDE/FAO, 2007. Agricultural Outlook 2007-2016, Organisation for economic co-operation and development / Food and agriculture organization of the United Nations. USA 88 pp.
- Ogilvie, S.C., Eason, C.T., 1998. Evaluation of iophenoxic acid and rhodamine B for marking feral ferrets (*Mustela furo*). New Zealand Journal of Zoology. 25, 105-108.
- O'Neal, J.S., Schulman, S.G., Giesen, W.F., Roomer, A.C.J., 1982. Alkaline hydrolytic lability of some hydroxy- and methoxycoumarins and related anticoagulants. International Journal of Pharmaceutics. 12, 355-359.
- Pain, D.J., Carter, I., Sainsbury, A.W., Shore, R.F., Eden, P., Taggart, M.A., Konstantinos, S., et al., 2007. Lead contamination and associated disease in captive and reintroduced red kites *Milvus milvus* in England. Science of The Total Environment. 376, 116-127.
- Papillon, Y., Buffiere, L., Butet, A., 2002. Rhodamine B as a collective marker for studying movements of small mammals. Acta Theriologica. 47, 491-497.
- Parker, L.W., Doxtader, K.G., 1983. Kinetics of microbial degradation of 2,4-D in soil: effects of temperature and moisture. Journal of Environmental Quality 12, 553-558.

## VI. Références bibliographiques

---

- Parmar, G., Bratt, H., Moore, R., Batten, P.L., 1987. Evidence for a common binding site in vivo for the retention of anticoagulants in rat liver. *Human Toxicology*, 6, 431-432.
- Pejcoch, M.K., 2006. Ecology, epidemiology and prevention of Hantavirus in Europe. In: Menne B, Ebi KL, editors. *Climate change and adaptation: strategies for human health*. Darmstadt: WHO, Steinkopff Verlag; 243-267.
- Pelfrene, A.F., 1991. Synthetic organic rodenticides. In *Handbook of pesticides toxicology*, volume 3: Class of pesticides, Hayes WJ Jr and Laws ER Jr (Eds), Academic press, Inc., San Diego, 1271-1316.
- Pelz, H.J., Rost, S., Hünerberg, M., Fregin, A., Heiberg, A.C., Baert, K., MacNicoll, A.D., Prescott, C.V., Walker, A.S., Oldenburg, J. & Müller, C.R. 2005. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*. 170, 1839-1847.
- Petterino, C., Paolo, B., 2001. Toxicology of various anticoagulant rodenticides in animals. *Veterinary and Human Toxicol.* 46, 353-360.
- Pineiro, J.C., Bates, D.M., 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-Plus*. Springer-Verlag, editors. New York. 528 pp.
- Poché, R.M., 1986. The status of bromadiolone in the United States. In: T. P. Salmon, (Ed.), *Proceedings Twelfth Vertebrate Pest Conference*, Davis, California, 6-15.
- Poché, R.M., 1988. Rodent tissue residue and secondary hazard studies with bromadiolone. *Bulletin OEPP/EPPO*. 18, 323-330.
- Potts, G.R., 1986. *The Partridge: Pesticides, Predation and Conservation*. Collins, London, UK.
- Pouliquen, H., 2001. Intoxication par un rodenticide anticoagulant. *Point vét.*, 32, 221, 36-39.
- Powles, S.B., Lorraine-Colwill, D.F., Dellow, J.J., Preston, C., 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science*. 46, 604-607.
- Pradel, R., 1993. Flexibility in Survival analysis from recapture data: Handling trap-dependence. Pages 29-37. In J.D. Lebreton and P.M. North, editors. *Marked individuals in the study of bird population*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Prescot, C., Greaves, J., 1999. Superrat lives! *Pesticide outlook*, 10, 230-233.
- Presnell, S.R., Stafford, D.W., 2002. The vitamin K-dependant carboxylase. *Thrombosis and haemostasis*. 87 (6), 937-946.
- Puyt, J.D., Sachot, E., Larhantec-verdier, M., et al., 2000. Oral bioavailability of bromadiolone in cows (abstr), In: *Proceedings. 9<sup>th</sup> Meet Eur Assoc Vet Pharmacol toxicol*.
- R Development Core Team, 2004. *R: A language and environment for statistical computing*. ISBN 3-900051-00-3. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- Ramade, F., 2007. *Introduction à l'écotoxicologie, fondements et applications*, Editions Lavoisier, France, 617pp.
- Raoul, F., 2001. *Ecologie de la transmission d'Echinococcus multilocularis chez le renard dans l'Est de la France: dependence au paysage et à la relation proie-predateurs? Thèse de doctorat de l'Université de Franche-Comté 14 décembre 2001 n° 875, Besançon, 164pp.*
- Raoul, F., Defaut, R., Michelat, D., Montadert, M., Pépin, D., Quéré, J. P., Tissot, B., et al., 2001. Landscape effects on the populations dynamics of small mammal communities: a preliminary analysis of prey-resource variations. *Revue d'écologie. (Terre Vie)*. 56, 339-352.

- Raoul, F., Michelat, D., Ordinaire, M., Decote, Y., Aubert, M., Delattre, P., Deplazes, P., et al., 2003. *Echinococcus multilocularis*: secondary poisoning of fox population during a vole outbreak reduces environmental contamination in a high endemicity area. *International Journal for Parasitology*. 33, 945-954.
- Rausch, R.L., 1995. Life-cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: *Echinococcus* and hydatid disease (eds R.C.A. Thomson & A.J. Lymbery), pp. 89-134. CAB International, Wallingford - Oxon.
- Record, C.R., Marsh, R.E., 1988. Rodenticide residues in animal carcasses and their relevance to secondary hazards. In: Crabb AC, Marsh RE, editors. *Proceedings of the 13th Vertebrate Pest Conference*, 163-168.
- Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T., 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*. 108 (1), 103-112.
- Ricklefs, R.E., Miller, F.L., 2000, *Ecology, Fourth Edition*, W.H. Freeman and Compagny, USA
- Riba, G., Silvy, C., 1989. *Combattre les ravageurs des cultures, enjeux et perspectives*. INRA, Paris, 230 pp.
- Riley, S.P.D., Bromley, C., Poppenga, R.H., Uzal, F.A., Whited, L., Sauvajot, R., 2007. Anticoagulant Exposure and Notoedric Mange in Bobcats and Mountain Lions in Urban Southern California. *Journal of Wildlife Management*. 71, 1874-1884.
- Robben, J.H., Kuijpers, E.A.P., Mout, H.C.A., 1998. Plasma superwarfarin levels and vitamin K1 treatment in dogs with anticoagulant rodenticide poisoning. *The Veterinary Quarterly*. 20, 24-27.
- ROPRE, 1998. *Rongeurs, paysages et prédateurs; résultats de synthèse de cinq années d'observation*. Plaquelette éditée par le Maison de la réserve naturelle du lac de Remoray. 31pp.
- Sage, M., Coeurdassier, M., Defaut, R., Lucot, E., Barbier, B., Rieffel, D., Berny, P., et al., 2007. How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*? *Environmental Pollution*. 148, 372-379.
- 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*. *Science of the total environment*. 407, 211-222
- SAGIR, 1990-2007. *Traitement de campagnols aux anticoagulants. Evaluation de la mortalité de la faune non cible dans le Doubs*. Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage. Doubs, France.
- Sakamoto, Y., Ishiguro, M., Kitagawa, G., 1996. *Akaike Information Criterion Statistics*. D. Reidel Publishing Company.
- Saucy, F., Meylan, A., Poitry, R., 2001. Lessons from 18 years of use of anticoagulants against fossorial *Arvicola terrestris* in switzerland. In: Pelz, J., Cowan, P., Feare, C., editors. *Advances in vertebrate pest management II*. Filander Verlag, Fürth, 71-90.
- Saucy, F., Schneiter, B., 1998. Juvenile dispersal in the vole *Arvicola terrestris* during rainy nights: a preliminary report. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*. 84, 333-345.
- Shearer, M.J., 1990. Vitamin K and vitamin K-dependant proteins. *British journal of haematology*, 75, 156-162.
- Sheffield, S.R., Lochmiller, R.L., 2001. Effects of field exposure to diazinon on small mammals inhabiting a semienclosed prairie grassland ecosystem. I. Ecological and reproductive effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 284-296.



## VI. Références bibliographiques

---

- Shore, R.F., Birks, J.D.S., 1999. Freestone, P., Exposure of non-target vertebrates to second-generation rodenticides in Britain, with particular references to the polecat *Mustela putorius*. *New Zealand Journal of Ecology*. 23, 199-206.
- Shore, R.F., Rattner, B.A., 2001. *Ecotoxicology of wild mammals*. Ecological & Environmental Toxicology Series, Wiley Eds Chichester, England.
- Shore, R.F., Birks, J.D.S., Freestone, P., Kitchener, A.C., 1996. Second-generation rodenticides and polecats (*Mustela putorius*) in Britain. *Environmental Pollution*. 91 (3), 279-282.
- Shore, R.F., Birks, J.D.S., Afsar, A., Wienburg, C.L., Kitchener, A.C., 2003. Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. *Environmental Pollution*. 122, 183-193.
- Siegel, S., Castellan, N.J., 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. Mc Graw-Hill International, New York.
- Sijm, D., Kraaij, R., Belfroid, A., 2000. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environmental Pollution*. 108, 113-119.
- Smith, P.N., Cobb, G.P., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S.T., Rainwater, T.R., Reynolds, K.D., 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution*. 150, 41-64.
- Sokal, P.R., Rohlf, F.J., 1997. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Compagny, New York, USA.
- Soulas, G., Lagacherie, B., 2001. Modelling of microbial degradation of pesticides in soils. *Biology and Fertility of Soils*. 33, 551-557.
- Spare, W., 1992. Hydrolysis of Bromadiolone : Lab Project Number : 1414. Unpublished study prepared by Agrisearch Inc. 62pp.
- Spare, W., Olson, S.B., 1980. <sup>14</sup>C-Bromadiolone soil leaching., Unpublished report submitted to WHO by Lipha S.A. Biospherics Inc., Beltsville, Maryland.
- Spurr, E.B., 2002a. Iophenoxic acid as a systemic blood marker for assessment of bait acceptance by stoats (*Mustela erminea*) and weasels (*Mustela nivalis*). *New Zealand Journal of Zoology*. 29, 135-142.
- Spurr, E.B., 2002b. Rhodamine B as a systemic hair marker for assessment of bait acceptance by stoats (*Mustela erminea*). *New Zealand Journal of Zoology*. 29, 187-194.
- Spurr, E.B., Maitland, M.J., Taylor, G.E., Wright, G.R.G., Radford, C.D., Brown, L.E., 2005. Residues of brodifacoum and other anticoagulant pesticides in target and non-target species, Nelson Lakes National Park, New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*. 32, 237-249.
- Stafford, D.W., 2005. The vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3, 1873-1878.
- Stoate, C., Boatman, N.D., Borralho, R.J., Carvalho, C.R., de Snoo, G.R., Eden, P., 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management*. 63, 337-365.
- Stone, W.B., 1979. Poisoning of wild birds by organophosphate and carbamate pesticides. *New York Fish and Game Journal*. 26, 37-47.
- Stone, W.B., Okoniewski, J.C., Stedelin, J.R., 1999. Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *Journal of Wildlife Diseases*. 35, 187-193.
- Story, P., Cox, M., 2001. Review of the effects of organophosphorus and carbamate insecticides on vertebrates. Are there implications for locust management in Australia? *Wildlife Research*. 28, 179-193.

- Stout, S.J., Dacunha, A.R., Picard, G.L., Safarpour, M.M., 1998. Simplification of analytical methods in pesticide residue analysis by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analyst Chemists International*. 81, 685-690.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Wait, L.P. & Bouvet, J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*. 26, 3189-3194
- Taberlet, P., Luikart, G., & Geffen, E., 2001. New methods for obtaining and analysing genetic data from free ranging carnivores. In: *Carnivore conservation*, Gittleman J.L. et al. (Eds). Cambridge University Press.
- Thijssen, H.H., Ritzen, B., 2003. Acenocoumarol pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 2C9 genotype. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 74, 61-8.
- Timbrell, J.A., Drapper, R., Waterfield, C., 1994. Biomarkers in toxicology: new uses for old molecules. *Toxicology and Ecotoxicology News*. 1, 4-14.
- The Merck Veterinary Manual 2005. Cynthia, M., Kahn and Scott Line (Editor); 9 edition (February 8, 2005)
- Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2004. Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27, 427-439.
- Townson, H., Nathan, M.B., Zaim, M., et al. (2005): Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bull World Health Organisation*. 83, 942-946.
- Traas, T.P., Luttick, R., Jongbloed, R.H., 1996. A probabilistic model for deriving soil quality criteria based on secondary poisoning of top predators. I Model description and uncertainty analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 34, 264-278.
- Treml, F., Pejcoch, M., Holesovska, Z., 2002. Small mammals – natural reservoir of pathogenic leptospire. *Veterinarni Medicina – Czech*. 47,309–314.
- Tremolières, C., 2003. Cinétique d'intoxication d'*Arvicola terrestris* par la bromadiolone dans le cadre de la lutte collective. Contribution à l'évaluation du risque pour la faune non cible. Thèse Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.
- UIPP, 2005. Dossier d'informations sur les produits de protection des plantes, Union des Industries de la Protection des Plantes. Boulogne, France. [www.uipp.org](http://www.uipp.org)
- USEPA, 1998. Registration Eligibility Decision (RED) Rodenticide Cluster. EPA 738-R-98-007. Environmental Protection Agency, United States.
- VanGessel, M.J., 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Science*. 49, 703-705.
- Veeh, R.H., Inskeep, W.P., Camper, A.K., 1996. Soil depth and temperature effects on microbial degradation of 2,4-D. *Journal of Environmental Quality* 25, 5-12.
- Vein J., Grandemange A., Lasseur R., Benoit E., Berny P., 2007. The resistance of rodents to anticoagulants: what about water voles after field treatment. VI<sup>th</sup> European Vertebrate Pest Conference, 11-15 septembre 2007, Reading, UK.
- Vermeer, C., 1984. The vitamin K1 dependent carboxylation reaction. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 61, 17-35.
- Viel, J.F., Giraudoux, P., Abrial, V., Bresson-Hadni, S., 1999. Water vole (*Arvicola terrestris scherman*) density as risk factor for human alveolar echinococcosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61, 559-565.
- Völk, S., Galicia, H., 1992. <sup>14</sup>C-Bromadiolone: Degradation and metabolism in soils incubated under aerobic conditions. (Unpublished report submitted to WHO by Lipha S.A., Lyon), Umweltchemie AG. Itingen, Switzerland.

## VI. Références bibliographiques

---

- Wandeler, P., Funk, S. M., 2006. Short microsatellite DNA markers for the red fox (*Vulpes vulpes*). *Molecular ecology notes*. 8, 98-100.
- Walker, A., Barnes, A., 1981. Simulation of herbicide persistence in soil: a revised computer model. *Pesticide Science*. 12, 123-132.
- Walker, L.A., Turk, A., Long, S.M., Wienburg, C.L., Best, J., Shore, R.F., 2008. Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Science of The Total Environment*. 392, 93-98.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Marine Ecology Progress Series*. 147, 149-157.
- Wallin, R., Huston, S.M., 2004. Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends in molecular medicine*. 10, 299-302.
- Wandeler, P., Funk, S.M., 2006. Short microsatellite DNA markers for the red fox (*Vulpes vulpes*). *Molecular ecology notes*. 8, 98-100.
- Waren, C., MacKay, D., Whelan, M., Fox, K., 2005. Mass balance modelling of contaminants in river basins: A flexible matrix approach. *Chemosphere*. 61 (10), 1458-1467.
- Weber, J.M., Aubry, S., 1993. Predation by foxes, *Vulpes vulpes*, on the fossorial form of the water vole, *Arvicola terrestris scherman*, in western Switzerland. *Journal of Zoology (Lond)*. 229, 553-559.
- Wehrens, R., Putter, H., Buydens, L.M.C., 2000. The bootstrap: a tutorial. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 54, 35-52.
- Weihong, J., Veitch, C.R., Craig, J.L., 1999. An evaluation of the efficiency of rodent trapping methods: the effect of trap arrangement, cover type, and bait. *New Zealand Journal of Ecology*. 23, 45-51.
- Whilton, D.S., Sadowski, J.A., Suttie, J.W., 1978. Mechanism of coumarin action : significance of vitamine K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry*, 17, 1371-1377.
- WHO, 1982. Instructions for determining the susceptibility or resistance of rodents to anticoagulants rodenticides. *World Health Organisation Vector Biol. Control*. Ser. 82, 843-849.
- WHO, 1995. Anticoagulant Rodenticides - Environmental Health Criteria 175. In: E. H. C. 175, (Ed.). *World Health Organization, International Programme on Chemical Safety*, Geneva. 97 pp.
- WHO, 2003. Principes directeurs pour la gestion des pesticides utilisés en santé publique – Rapport d’une consultation interrégionale de l’OMS Chiang Mai (Thaïlande 25-28 février 2003). *WHO/CDS/WHOPES/2003.7*. 88 pp.
- WHO, 2006. Chikungunya à la Réunion (France). *World Health Organisation*. <http://www.who.int>
- Widianarko, B., Van Straalen, N., 1996. Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15, 402-406.
- Woody, B.J., Murphy, M.J., Ray, A.C., Green, R.A., 1992. Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 6, 23-28.
- Wright, G.R.G., 2002. Protocol for Tissue Sampling Testing for Vertebrate Pesticides in Animals. *Landcare Research New Zealand*. 1-8.
- Yuen, S.H., 1978. Determination of the rodenticides difenacoum and brodifacoum in finished baits by reversed-phase liquide chromatography. *Analyst*. 103, 842-850.
- Woody, B.J., Murphy, M.J., Ray, A.C., Green, R.A., 1992. Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 6, 23-28.

## **Transfert de bromadiolone (appâts/sols – campagnols de prairie – renards) : Etude environnementale de la persistance et mesure indirecte de l'exposition**

Depuis les années 50, les rodenticides anticoagulants sont couramment utilisés pour contrôler les populations de rongeurs commensaux et de prairie. De nombreux empoisonnements de la faune non cible sont répertoriés partout dans le monde. En Europe de l'Ouest notamment, la bromadiolone est utilisée de façon intensive dans les champs. Elle est le seul rodenticide autorisé en France pour contrôler les populations de Campagnol terrestre, *Arvicola terrestris Sherman*. Ces opérations utilisant des appâts grains de blé enterrés dans le sol sont réalisées à de larges échelles et des dizaines voire des centaines d'empoisonnements secondaires de prédateurs, dont le renard, sont répertoriés chaque année. Cette étude propose d'apporter des éléments de compréhension sur les modalités de son transfert à travers les systèmes biologiques complexes considérés dans leur intégralité.

Le premier objectif a été d'évaluer la variabilité environnementale de la persistance de la bromadiolone dans les appâts en conditions naturelles. Cette persistance dans les galeries de traitement est courte (demi-vie de 3 à 6 jours) et faiblement influencée par les conditions environnementales (type de sol et conditions climatiques). Cependant, elle augmente considérablement lors du stockage des appâts dans des réserves (27 < demi-vie < 45 jours) et peut constituer un risque d'exposition des rongeurs sur des périodes beaucoup plus longues.

Le second objectif a été d'évaluer la cinétique d'intoxication des populations de rongeurs dans les zones traitées avec dans notre cas comme espèce cible, le Campagnol terrestre, et une espèce non cible, le Campagnol des champs *Microtus arvalis*. Les résidus de bromadiolone dans les deux populations atteignent des concentrations maximales entre 3 et 5 jours après le traitement en fonction de l'espèce ou des tissus et des valeurs élevées sont maintenues pendant 15 à 20 jours. Cependant, la recolonisation de terriers traités peut induire une exposition de rongeurs jusqu'à 3 mois après la distribution des appâts. Ce phénomène permettrait d'expliquer en partie le fait que des rongeurs présentant des résidus de bromadiolone soient disponibles pour des prédateurs plus de 4 à 6 mois après le traitement.

Le dernier objectif a été d'évaluer la faisabilité de mesurer, en nature, l'exposition de renards par l'analyse des résidus de bromadiolone dans leurs fèces. Une nouvelle méthode analytique en Chromatographie Liquide et Spectrométrie de Masse a été développée pour les dosages. Les résidus en bromadiolone dans les fèces et dans le plasma de renards captifs nourris pendant cinq jours avec des campagnols intoxiqués montrent des évolutions temporelles similaires : une augmentation rapide pendant la phase d'exposition puis une diminution progressive après celle-ci. La bromadiolone a été détectée dans les fèces dès le premier prélèvement 15 heures après la première exposition et pendant toute la durée de l'expérimentation, i.e., 24 jours après la dernière exposition. La dose administrée (1000 µg broma / j) se serait probablement révélée mortelle pour deux des quatre renards exposés sans l'administration d'antidote. Deux expérimentations ont ensuite été menées en nature. La première a montré que 48% des fèces collectées dans une zone traitée entre 15 et 45 jours auparavant, présentaient des résidus de bromadiolone mesurable. La seconde a montré qu'une relation d'ordre exponentiel liait les résidus de bromadiolone mesurés dans le foie et ceux mesurés dans les contenus rectaux de renards prélevés dans une zone traitée entre un et six mois auparavant.

Ces travaux permettent d'envisager une évaluation indirecte de l'exposition *in situ* de populations de renards à large échelle spatiale et temporelle. Après l'optimisation de cette méthode de mesure, nous pourrions alors déterminer si différents facteurs environnementaux peuvent moduler cette exposition et cela sans impliquer ni la capture ni la mort de l'animal.

**Mots clé :** Transfert, pesticide, niveaux trophiques, facteurs environnementaux, écosystème terrestre, vertébrés, rodenticide anticoagulant de seconde génération

## **Bromadiolone transfer (baits/soils – grassland rodents – foxes): Environmental study of the persistence and non-invasive method for the exposure monitoring**

Second Generation Anticoagulant Rodenticides (SGARs) are currently used for controlling small mammalian pests. Evidences of their negative impact on wildlife have been reported worldwide. In some countries, particularly in Europe, the SGAR bromadiolone is intensively used in the field. It is the only rodenticide authorised in France for controlling the population outbreaks of the Water vole *Arvicola terrestris Sherman*. Vole control operations using bromadiolone are undertaken over large areas (e.g., hundreds of km<sup>2</sup>), and dozens to hundreds of secondary poisonings of Red foxes (*Vulpes vulpes*) have been reported each year.

The first aim was to measure bromadiolone persistence in wheat baits and its variability in field conditions. The persistence of bromadiolone in artificial galleries is short (half-life 3-6 days) and weakly influenced by environmental conditions (soil type and climatic conditions). However, this persistence is dramatically increased in baits when they were stored (27 < half-life < 45 days). This may cause rodent exposure on a longer duration.

The second objective was to assess the kinetic of bromadiolone residues in rodent populations in a treated area. Here, both the Water vole (the target species) and the Common vole *Microtus arvalis* (a non target species), two rodent species having high density in grassland and both eaten by predators, were studied. Bromadiolone residues in rodent population reached the maximum concentration from the third to the fifth day depending on the species or the tissue and the high concentrations are maintained during 15-20 days. However, the re-colonization in the treated parcel by rodents from the neighbourhood may induce consequences with exposure of rodent until three months after bait distribution. This may explain in part why rodents with bromadiolone residues may be potentially available to predators more than four to six months after a treatment.

Finally, we assessed the feasibility of monitoring the exposure of foxes to bromadiolone by analysing the residues in faeces following field treatments. A new LC - MS method was developed. Bromadiolone residues in faeces and blood exhibited similar patterns over time: a dramatic increase during the exposure period (2 or 5 days according to foxes) and then a gradual decrease after the last exposure. Bromadiolone was detected in faeces 15 hours after the first exposure and for at least 24 days after the last exposure (end of the experiment). Two of the foxes presented severe external haemorrhages six days after the first exposure. Their prothrombin time (PT) was multiplied by 6 compared to the day before exposure and they would probably have died without vitamin-K administration. Then, two other studies were achieved *in situ*. The first demonstrated that 48 % of faeces sampled in an area treated between 15 to 45 days before, contained bromadiolone residues. The second demonstrated an exponential relationship between the rectum content of foxes trapped in an area treated 1 to 6 months before the field surveys, and the residues measured in the liver.

These findings provide a basis for programs aiming to monitor the exposure *in situ* of wild fox populations to bromadiolone using non-invasive methods based on standard sampling and analysis of residues in faeces. After optimisation, it will be possible to determine if different environmental factors may affect fox population exposure without trapping and/or animal death.

**Key words:** Transfer, pesticide, food webs, environmental factors, terrestrial ecosystems, vertebrates, Second Generation Anticoagulant Rodenticide