



HAL
open science

Étude de l'impact du sexe sur la coagulation vitamine K dépendante chez le rat

Sébastien Lefebvre

► **To cite this version:**

Sébastien Lefebvre. Étude de l'impact du sexe sur la coagulation vitamine K dépendante chez le rat. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1231 . tel-01425285

HAL Id: tel-01425285

<https://theses.hal.science/tel-01425285>

Submitted on 9 Jan 2017

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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1231

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale « EDISS » N° 205

(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé)

Spécialité de doctorat : Biochimie

Soutenue publiquement le 29/11/2016, par :

Sébastien LEFEBVRE

ETUDE DE L'IMPACT DU SEXE SUR LA COAGULATION VITAMINE K DEPENDANTE CHEZ LE RAT.

Devant le jury composé de :

M. GUITTON, Jérôme	Professeur de toxicologie Université de Lyon 1	Président
Mme KAMMERER, Martine	Professeur de Pharmacie-Toxicologie, ONIRIS	Rapporteur
M. PETIT Claude	Professeur de Pharmacie-Toxicologie, ENVT	Rapporteur
Mme SIGURET, Virginie	Professeur d'Hématologie, Université Descartes	Examinatrice
M. GUITTON, Jérôme	Professeur de toxicologie Université de Lyon 1	Examineur
Mme LATTARD, Virginie	Maître de Conférences Pharmacie, VetAgro-Sup	Directrice de thèse
M. BENOIT, Étienne	Professeur Biochimie, VetAgro-Sup	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUICHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

IDENTITE NUMERIQUE DE L'AUTEUR

Afin de faciliter l'accès à mes futurs travaux, veuillez trouver ci-dessous mes références numériques.

Nom du site	Adresse url	Code QR
ORCID	http://orcid.org/0000-0003-0722-1853	
ResearchGate	https://www.researchgate.net/profile/Sebastien_Lefebvre4	
LinkedIn	https://fr.linkedin.com/in/drlefebvre	

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Martine KAMMERER et Monsieur le Professeur Claude PETIT

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter de rapporter cette thèse,

Pour le temps consacré à la lecture de mon manuscrit ainsi qu'à l'élaboration de votre rapport,

Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Virginie SIGURET et Monsieur le Professeur Jérôme GUITTON

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter de participer au jury de cette thèse,

Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Virginie LATTARD et Monsieur le Professeur Etienne BENOIT

Qui ont accepté d'encadrer et de corriger ce travail,

Pour m'avoir proposé ce sujet passionnant,

Pour leur aide et leurs précieux conseils,

Qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond respect et qu'ils perçoivent mes sincères remerciements.

A mes Parents, pour avoir fait de moi ce que je suis
Pour leur soutien et leur amour

A Virginie, pour le Bonheur que tu m'apportes
Ta gentillesse et ta présence dans les bons moments
Et ton réconfort dans les moments difficiles

A Kilou, pour ton indéfectible soutien durant toutes ces années

A mes Grands Parents, pour tous ces bons moments passés ensemble
Ces vacances à la montagne, à la mer, en Espagne...

A mes frères, pour les moments passés en familles

A Chloé et Alexandre mes Poulots, pour les bons repas et les discussions en conf

A Virginie et Etienne, pour m'avoir donné la possibilité de faire de la recherche
Et de m'y accompagner encore aujourd'hui

A Laurent, Denis, Virginie et Etienne, pour cette folle année

A Benjamin, pour ton accueil au sein du labo

A Abdé, pour ta disponibilité et ta serviabilité

A Marlène, Claire et Ludivine pour leur aide.

A Maylis, pour sa joie de vivre

A Tessa, qui m'accompagné dans le monde Kafkaïen du master 2 et de son administration

A l'équipe du Labo, pour leur aide

A Magali, pour m'avoir fait découvrir ce métier

A Véronique, pour m'avoir formé

A ma Famille

Merci

*Whenever you are asked if you can do a job, tell 'em, 'Certainly I can!'
Then get busy and find out how to do it.*

Theodore Roosevelt

A la mémoire de Jacques Lefebvre et de Joséphine Auffret

TABLE DES MATIERES

IDENTITE NUMERIQUE DE L'AUTEUR	5
REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	13
TABLE DES FIGURES.....	15
TABLE DES TABLEAUX	19
LISTE DES PUBLICATIONS.....	21
LISTE DES ABREVIATIONS	23
RESUME.....	25
I. INTRODUCTION	27
II. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	29
II.1 L'HEMOSTASE	29
II.1.1 <i>Physiologie de l'hémostase</i>	30
II.1.2 <i>Exploration de l'hémostase</i>	39
II.2 LES VITAMINES K ET LEURS ACTIONS	49
II.2.1 <i>Les vitamines K</i>	49
II.2.2 <i>Propriétés physico-chimiques</i>	49
II.2.3 <i>Disponibilité dans l'environnement</i>	51
II.2.4 <i>Pharmacocinétique</i>	51
II.2.5 <i>Modes d'action des vitamines K et protéines vitamine K dépendantes</i>	53
II.2.6 <i>Recyclage des vitamines K</i>	58
II.3 LES ANTI-VITAMINES K.....	63
II.3.1 <i>Historique</i>	63
II.3.2 <i>Enjeux des anticoagulants</i>	63
II.3.3 <i>Les molécules anti-vitamines K</i>	65
II.3.4 <i>Mécanisme d'action</i>	67
II.3.5 <i>Élimination</i>	67
II.3.6 <i>Article 1 : La résistance aux anti-vitamines K et son étude</i>	68
II.3.7 <i>Les opportunités de nouveaux anticoagulants anti-vitamines K d'origine naturelle</i>	97
II.4 SENSIBILITE AUX ANTI-VITAMINES K LIEE AU SEXE	101
II.4.1 <i>Constat de l'influence du sexe sur la sensibilité aux anticoagulants</i>	101
II.4.2 <i>Paramètres de la coagulation vitamine K dépendante influencés par le sexe</i>	102

III.	PARTIE EXPERIMENTALE DE L'ETUDE DE L'IMPACT DU SEXE SUR LA COAGULATION VITAMINE K	
	DEPENDANTE CHEZ LE RAT.	107
III.1	OBJECTIFS	107
III.2	STRATEGIE	109
III.3	ETUDES	111
III.3.1	<i>Article 2 (soumis): Suivre de la coagulation vitamine K dépendante chez le rat – vers une évolution de la méthodologie pour détecter la résistance des rats</i>	111
III.3.2	<i>Article 3 (en cours de rédaction): Test de génération de thrombine un outil fiable dans l'évaluation de la pharmacodynamie des anticoagulants rodenticides chez les rongeurs</i>	145
III.3.3	<i>Article 4 : De l'origine des différences de résistance naturelle aux anti-vitamine K liées au genre chez le rat</i>	147
IV.	AUTRES TRAVAUX	157
IV.1	OBJECTIFS	157
IV.2	STRATEGIE	158
IV.3	ETUDES	159
IV.3.1	<i>Article 5 : Comparaison des effets inhibiteurs du féruléol et de la ferprenine, contenus dans le chémotype toxique de Ferula communis, sur l'activité VKORC1 des foies de mammifère</i>	159
IV.3.2	<i>Article 6 (soumis): Variabilité des concentrations en féruléol et ferprénine dans les feuilles de grande férule (Ferula sp.)</i>	169
IV.3.3	<i>Article 7 (soumis): Gestion des populations de rongeurs avec des anticoagulants rodenticides : Vers une troisième génération d'anticoagulants rodenticides</i>	201
V.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	241
V.1	ÉTUDE DES CARACTERISTIQUES DE VKORC1 DES MICROSOMES DE FOIES PROVENANT DE RATS MALES ET FEMELLES	243
V.2	RAFFINEMENT DES METHODES D'EXPLORATION DE LA COAGULATION DANS LE CADRE DE L'ÉVALUATION DE LA RESISTANCE AUX AVK	245
V.3	ÉTUDE DES PARAMETRES DE LA COAGULATION BASALE EN FONCTION DU GENRE	251
V.4	ÉTUDE COMPAREE DE L'ÉVOLUTION DES PARAMETRES DE LA COAGULATION APRES ADMINISTRATION DE DIFETHIALONE CHEZ DES RATS MALES ET FEMELLES	253
V.5	ÉTUDE DES OPPORTUNITES DE NOUVEAUX AVK	259
VI.	CONCLUSION	265
VII.	BIBLIOGRAPHIE	267
VIII.	ANNEXES	289
VIII.1	ANNEXE 1	289
VIII.2	ANNEXE 2	293

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Phase plaquettaire de l'hémostase primaire. 1 activation plaquettaire. 2 adhésion plaquettaire aux facteurs de von Willebrand présentés par la media et dégranulation des plaquettes. 3 agrégations plaquettares par l'intermédiaire de la fibrine.	31
Figure 2 : Schéma simplifié de la cascade de la coagulation	37
Figure 3 : Représentation graphique d'un thromboélastogramme d'après [150].	44
Figure 4 : courbe de résultat d'un test de génération de thrombine et ses principaux paramètres.	46
Figure 5 : Schéma de la cascade de réaction aboutissant à la formation de p-nitroaniline à partir de Sxa-11 (substrat chromogène spécifique du facteur X activé) permettant la quantification du facteur VII.	47
Figure 6 : Structure des différentes classes de vitamine K. (A) Ménadione (vitamine K ₃) avec numérotation des atomes de carbone du cycle d'intérêt. (B) Phylloquinone (vitamine K ₁). (C) Ménaquinone 4 (vitamine K ₂). (D) Ménaquinone 7 (vitamine K ₂).	50
Figure 7 : Cycle de la vitamine K. VKORC1 : vitamine K époxyde réductase complexe 1 ; NQO1 : NADPH quinone-oxydoréductase 1 ; GGCX : Gamma glutamyl carboxylase ; PVKD : Protéine vitamine K dépendante.	58
Figure 8 : Schéma de la réaction de γ -carboxylation médiée par l'enzyme gamma glutamyl carboxylase (GGCX). 1) un proton est arraché par GGCX à la vitamine K réduite. 2) Oxygénation de la vitamine K et formation d'une base forte intermédiaire. 3) Transformation du résidu glutamate en carbanion ; formation de H ₂ O et de la vitamine K-2, 3-époxyde. 4) Carboxylation et formation du résidu acide carboxyglutamique.	59
Figure 9 : Schéma du mécanisme permettant la transformation de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone, proposé par Matagrín et al. [114].	60
Figure 10 : Bases moléculaires des anticoagulants anti-vitamines K. À : base des dérivés de la 4-hydroxycoumarine ; B : base des dérivés de la 4-hydroxy-thiocoumarine ; C : base des dérivés de l'indane-1,3-dione.	65
Figure 11 : Exemples de molécules anti-vitamines K. À : Warfarine ; B : Fluindione ; C : Diféthialone ; D : Brodifacoum.	66
Figure 12 : photographie d'une grande fêrule (Gilbert Gault)	98

Figure 13 : structure chimique du férulenol (A) et de la ferprénine (B).....	99
Figure 14 : Stratégie pour étudier les différentes hypothèses sur l'origine de la plus grande tolérance aux anticoagulants des rats femelles	109
Figure 15 : test de génération de thrombine avec un protocole standard. TGT est effectué en ajoutant au plasma pauvre en plaquettes (PPP) des rats testés un réactif contenant soit 5 pM de facteur tissulaire et 4 µM de phospholipides (a) soit 20 pM de facteur tissulaire et 4 µM de phospholipides (b). Ronds noirs : PPP de rats non traités ; ronds vides : PPP de rats 24 h après l'administration de diféthialone ; croix : PPP de rats 72 h après l'administration de diféthialone.	146
Figure 16 : Cinétique de la hauteur du pic (PH) et du potentiel endogène de thrombine (ETP) obtenue par le test de génération de thrombine après une administration per os de diféthialone. Le TGT est effectué avec du PPP de rats auxquels 10 mg/kg de diféthialone a été administrée. Les PPP sont dilués au 7.5/10 avec un pool de plasma de rats non traités. La réaction est initiée avec 5 pM de facteur tissulaire. Les ronds noirs représentent les valeurs des rats femelles et les ronds blancs celles des mâles.	146
Figure 17 : Diagramme donnant pour chacun des diastéréoisomères de chacune des molécules sa constante d'inhibition sur microsomes de foie de rats sensibles en abscisse et en ordonnée son temps de demivie. BDL : bromadiolone, DFC : difénacoum, DFT : diféthialone, BDF : brodifacoum et FLO : flocoumafène.....	202
Figure 18 : Résumé des valeurs de demi-vie ou de temps de doublement pour les différents paramètres. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%.	247
Figure 19 : Évolution de l'activité des facteurs de la coagulation par rapport au temps de Quick durant la décroissance des facteurs et leur régénération.....	249
Figure 20: Evolution du temps de Quick après administration d'une dose létale de diféthialone chez des rats mâles (noir) et femelles (gris). (A) valeurs brutes en seconde du temps de Quick. (B) Valeurs après linéarisation par la fonction du logarithme népérien. ...	253
Figure 21 : Evolution du facteur VII après administration d'une dose létale de diféthialone chez des rats mâles (noir) et femelles (gris). (A) valeurs brutes en pourcentage d'activité (activité basale des mâles définie à 100%). (B) Valeurs après linéarisation par la fonction du logarithme népérien.	254

Figure 22 : Évolution de l'activité du facteur VII sur des rats ayant reçu une dose létale de difethialone puis 48h après une dose de vitamine K..... 256

Figure 23 : Carte de la répartition des différentes variétés de fêrule et leur concentration en composés anti-vitamines K. 261

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Facteurs thrombogènes et antithrombogènes circulants	29
Tableau II : Nomenclature des facteurs de la coagulation	32
Tableau III : Nom des différents paramètres et leur signification dans le système TEG et ROTEM [150].	44
Tableau IV : Valeur logP de quatre vitamines K.....	50
Tableau V: Protéines vitamines K dépendantes et leurs fonctions [52].....	54
Tableau VI : Dose efficace 50 (ED50) chez le rat mâle et femelle pour différents anticoagulants anti-vitamines K [137].....	101
Tableau VII : résumé des caractéristiques de chacune des techniques employées pour suivre la coagulation vitamine K dépendante à la suite de l'administration d'un AVK chez le rat. Trois caractéristiques, précocité, fiabilité et amplitude d'évolution sont analysées respectivement en fonction du temps de latence, du R ² et de la valeur absolue de la pente. (À, applicable, Q, questionnable, N, non applicable)	113
Tableau VIII : Résumé des constantes d'inhibition du férulénol, de la ferprénine et de la warfarine sur les microsomes de foie appartenant à différentes espèces.....	160
Tableau IX : résumé des valeurs médianes pour les mâles et les femelles de l'étude de l'activité enzymatique VKOR. Les valeurs entre crochets sont les valeurs minimales et maximales obtenues.	244
Tableau X : Bilan des valeurs remarquables des facteurs de la coagulation : concentration basale relative plus ou moins l'écart type et temps de demi-vie et son intervalle de confiance à 95%.	252
Tableau XI : Demi-vie des différents isomères d'AVK de seconde génération après une administration unique par voie orale de 3mg/kg.	263

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications dans des revues ou livres à comité de lecture:

Articles publiés:

LOUVET M-S., GAULT G., LEFEBVRE S., POPOWYCZ F., BOULVEN M., BESSE S., BENOIT E., LATTARD V. et GRANCHER D., 2015. Comparative inhibitory effect of prenylated coumarins, ferulenol and ferprenin, contained in the 'poisonous chemotype' of *Ferula communis* on mammal liver microsomal VKORC1 activity. *Phytochemistry*. 118, 124-130. DOI [10.1016/j.phytochem.2015.08.012](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.012) .

LEFEBVRE S., RANNOU B., BESSE S., BENOIT E. et LATTARD V., 2016. Origin of the gender differences of the natural resistance to antivitamin K anticoagulants in rats. *Toxicology*. 17, 344, 34-41. DOI [10.1016/j.tox.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.02.002).

LEFEBVRE S., BENOIT E. et LATTARD V., 2016. Comparative biology of the resistance to vitamin K antagonists – an overview of the resistance mechanisms. In : *Anticoagulation Therapy*, ed. Basaran O. and Biteker M. Ed. Intech, Rijeka (Croatie). ISBN 978-953-51-4695-7. DOI [10.5772/64204](https://doi.org/10.5772/64204)

Articles en cours de soumission:

GAULT G., LEFEBVRE S., LOUVET M-S., DORANI K., BENOIT E., LATTARD V. et GRANCHER D., Ferulenol and ferprenin levels in giant fennel (*Ferula sp.*) leaves in France. Soumis dans *Phytochemistry*.

DAMIN-PERNIK M., BERNADETTE E., LEFEBVRE S., FOUREL I., CARUEL H., BENOIT E. et LATTARD V., The management of rodent populations by anticoagulant rodenticides - Towards a third generation of anticoagulant rodenticides. Soumis dans *Drug Metabolism and Disposition*

LEFEBVRE S., HASCOËT C., DAMIN-PERNIK M., RANNOU B., BENOIT E. et LATTARD V., Monitoring of antivitamin K-dependent anticoagulation in rodents – towards an evolution of the methodology to detect resistance in rodents. Soumis dans *Pesticide Biochemistry and Physiology*

Article en cours de rédaction

JOURDI G., LEFEBVRE S., LE BONNIEC B., CURIS E., GAUSSEM P., LATTARD V. et SIGURET V. Thrombin generation test: a reliable tool to evaluate anticoagulant rodenticide pharmacodynamics in rodents

Communications dans des conférences internationales à comité de lecture:

LEFEBVRE S., GAULT G., LOUVET M-S., LATTARD V. et GRANCHER D., 2015. Ferulenol levels in french continental Giant fennel (*Ferula sp.*). In : XIXth Congress European society of Veterinary & Comparative Nutrition (ESVCN). Toulouse (France). (Poster en annexe 1)

LEFEBVRE S., RANNOU B., BESSE S., DAMIN-PERNIK M., BENOIT E. et LATTARD V., 2016. Preliminary study on the efficiency of vitamin K on hypocoagulable rats. In : XXth Congress European society of Veterinary & Comparative Nutrition (ESVCN). Berlin (Allemagne). (Poster en annexe 2)

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide déoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

AVK : Anticoagulants anti-vitamines K

CYP : Cytochrome P-450

FT : Facteur tissulaire

Gas6 : Growth arrest-specific gene 6

GGCX : Gamma glutamyl carboxylase

Gla: Acide aminé gamma-carboxyglutamate

Glu : Acide aminé glutamique

INR : International normalised ratio

Ki: Constante d'inhibition

KM: Constante de Michaelis-Menten

LPL : Lipoprotéines-lipase plasmatiques

MK-n : Ménaquinone n

NQO1 : NAD(P)H quinone oxydoréductase 1

PCR : Polymerase chain reaction

TQ : Temps de Quick

VKOR : Vitamine K époxyde réductase

VKORC1 : Vitamine K époxyde réductase complexe 1

VKORC1L1 : Vitamine K époxyde réductase complexe 1 like 1

Vmax : Vitesse maximale

vW : Facteur de von Willebrand

RESUME

Les anticoagulants anti-vitamines K (AVK) sont des inhibiteurs du mécanisme de régénération de la vitamine K. Celle-ci est impliquée dans l'activation post-traductionnelle par gamma-carboxylation de nombreuses protéines, et notamment de quatre protéines essentielles à la coagulation. L'apport alimentaire en vitamine K n'étant pas suffisant pour remplacer le cycle de régénération, un cycle efficace de régénération de la vitamine K est nécessaire. Si des AVK bloquent ce cycle, la gammacarboxylation des facteurs de la coagulation n'est plus assurée, alors, la production de facteurs de la coagulation utilisables est fortement diminuée, ce qui affecte, par conséquent, le potentiel de la coagulation sanguine. Une inhibition importante du cycle de régénération peut entraîner la mort par hémorragies, c'est dans ce but que sont utilisés les AVK dans la lutte contre les rongeurs. Depuis une trentaine d'années, il a été remarqué que les rats femelles étaient moins sensibles aux AVK que les rats mâles. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence : (i) une activité microsomale responsable de la régénération de la vitamine K plus efficace chez les femelles; (ii) une élimination plus rapide des AVK par les rats femelles; (iii) des concentrations basales ou (iv) des demi-vies des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants plus élevées chez les femelles. Le but principal de ce travail est de déterminer l'origine de la différence de sensibilité des rats femelles aux AVK.

Les résultats mettent en évidence des différences significatives concernant les niveaux basaux et les cinétiques d'évolution certains facteurs de la coagulation, pouvant expliquer la plus faible sensibilité des femelles aux AVK.

I. INTRODUCTION

Les anticoagulants anti-vitamines K (AVK) sont des inhibiteurs du mécanisme de régénération de la vitamine K. Celle-ci est impliquée dans les transformations post-traductionnelles par gammacarboxylation nécessaire à l'activité de nombreuses protéines, et notamment de 4 protéines essentielles à la coagulation. L'apport alimentaire en vitamine K étant insuffisant pour couvrir à lui seul les besoins pour la gammacarboxylation, un cycle efficace de régénération de la vitamine K est nécessaire. Les AVK bloquant ce cycle, la gammacarboxylation des facteurs de la coagulation n'est plus assurée, ainsi, la production de facteurs de la coagulation utilisables est fortement diminuée, ce qui affecte, par conséquent, le potentiel de la coagulation sanguine. Ainsi, une inhibition partielle permet de fluidifier le sang (ce qui est recherché dans les traitements anti-thromboemboliques chez l'homme). Par conséquent, une inhibition plus importante du cycle de régénération peut entraîner des hémorragies mortelles, c'est dans ce but que sont utilisés les AVK, dans la lutte contre les rongeurs.

Chez l'homme, il est difficile de déterminer une zone thérapeutique, une dose trop faible n'a pas d'effet et peut même favoriser la coagulation alors qu'une dose trop importante peut entraîner une hémorragie. À cette difficulté de déterminer une dose thérapeutique, il faut ajouter l'importance des facteurs génétiques dans l'action des AVK. Ces facteurs sont à l'origine soit d'une plus grande sensibilité, soit d'une résistance au traitement. Ainsi, les besoins en warfarine (un AVK), pour obtenir le même objectif thérapeutique, varient selon les individus, entre 2 mg par personne et par jour et plus de 50 mg par personne et par jour. Même si, une part essentielle de la population nécessite une posologie de l'ordre de 5 mg par personne et par jour. Aujourd'hui, les techniques de génie génétique ont permis d'identifier le gène codant l'enzyme VKORC1 (Vitamine K epoxyde réductase complexe 1) responsable de la régénération de la vitamine K qui est aussi la cible des AVK. Or certaines mutations de ce gène diminuent la sensibilité de VKORC1 aux AVK. L'identification des mutations et l'étude de leurs conséquences devraient permettre d'améliorer la personnalisation des traitements chez l'homme.

Les mutations responsables de phénomènes de résistances aux AVK ont un intérêt primordial chez les rongeurs. Ainsi, connaître les prévalences et les caractéristiques, en termes de résistance et de spécificité d'inhibiteurs, des principales mutations chez les rongeurs devrait permettre d'utiliser des molécules plus adaptées, qui seront plus efficaces et limiteront l'émergence de nouvelles résistances.

Outre ces facteurs génétiques, une influence du sexe des individus, dans la sensibilité aux anticoagulants anti-vitamines K, a été décrite chez les rongeurs. Cependant peu de travaux apportent des réponses quant à l'origine de la différence de sensibilité liée au sexe.

Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans le projet global de l'unité qui est de décrire et comprendre les mécanismes de sensibilité et de résistances aux AVK mais aussi de limiter, en proposant des stratégies et des molécules nouvelles, l'écotoxicité des AVK rodenticides. L'objectif premier de ce travail est, après une rapide description des connaissances actuelles sur les AVK et la coagulation, d'explorer expérimentalement certaines pistes pouvant expliquer cette différence de tolérance aux AVK entre les rats femelles et les rats mâles. Le second objectif de notre travail est d'étudier les opportunités de nouveaux AVK, afin de proposer des solutions efficaces et durables dans la gestion des populations de rongeurs. L'axe principal de cet objectif est l'étude des anticoagulants naturellement produits par la grande fêrule (*Ferula communis*).

II. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 L'HEMOSTASE

La coagulation est un processus physiologique qui permet d'assurer l'hémostase. [Hémostase vient du grec : αἷμα (le sang) et στάσις (action de se tenir) ; l'hémostase est l'action de maintenir le sang dans le système vasculaire]. L'hémostase est un mécanisme essentiel au bon fonctionnement de l'organisme, permettant d'éviter des pertes de sang trop importantes, mais aussi de limiter des hémorragies internes qui peuvent avoir des conséquences néfastes même si elles n'impliquent qu'un faible volume sanguin (exemple : hémorragie cérébrale...). L'hémostase doit être rapide, mais rester circonscrite à la zone lésée pour garantir la circulation sanguine. Pour permettre cela, la majorité des enzymes permettant la coagulation circulent sous forme de zymogènes prêts à s'activer dans les zones où l'équilibre entre les facteurs thrombogènes et les facteurs antithrombogènes circulants (Tableau I) est en faveur de la coagulation [132].

Tableau I : Facteurs thrombogènes et antithrombogènes circulants

Facteurs thrombogènes	Facteurs antithrombogènes
Facteurs de la coagulation	Antithrombine
Plaquettes	Protéine C
Facteur d'activation plaquettaire	Protéine S
Facteur de Von Willebrand	Plasminogène
Facteur tissulaire circulant	

Le changement d'équilibre entre les facteurs thrombogènes et antithrombogènes est la plupart du temps consécutif à une lésion de l'endothélium du vaisseau sanguin. Cette lésion met à jour la media contenant du collagène et des facteurs de Von Willebrand (vW) qui sont tous deux thrombogènes. Pour les lésions plus profondes touchant l'adventice, un thrombogène, nommé le facteur tissulaire (FT), est exprimé par les péricytes et les fibroblastes de l'adventice et des tissus, ainsi que sur d'autres cellules comme les cellules épithéliales [40, 54].

Une fois que ces éléments sont réunis, l'hémostase s'enclenche en suivant trois étapes. La première assure une hémostase d'urgence et prépare la seconde étape. La seconde étape permet une hémostase plus longue. La dernière prépare la réparation de la zone lésée en éliminant les acteurs des étapes précédentes qui gênent la cicatrisation.

II.1.1 Physiologie de l'hémostase

II.1.1.1 L'hémostase primaire

L'hémostase primaire est la première étape de l'hémostase, elle permet de limiter rapidement et provisoirement l'hémorragie et d'amorcer les autres étapes de l'hémostase. Elle implique principalement les plaquettes, des protéines adhésives et la paroi des vaisseaux sanguins pour former un clou hémostatique [130]. En temps normal, cette formation du clou hémostatique est inhibée par l'endothélium. En effet, celui-ci présente à sa surface des glycosaminoglycanes, avec une structure similaire à l'héparine, et excrète des molécules anti-agrégations plaquettaires [132].

L'hémostase primaire est divisée en deux phases : la phase vasculaire puis la phase plaquettaire.

II.1.1.2 La phase vasculaire

Suite à la rupture d'une région de l'endothélium, une vasoconstriction passive se met en place. Celle-ci est due à l'élasticité intrinsèque des vaisseaux sanguins. De plus, l'endothélium sécrète de nombreuses hormones qui entraînent la vasoconstriction, cette fois active, du vaisseau sanguin et favorisent ainsi, l'agrégation plaquettaire et la coagulation [33]. Parallèlement, les cellules endothéliales adjacentes de la lésion perdent leurs propriétés anti-thrombotiques pour devenir pro-thrombotiques, en présentant à leur surface des facteurs tissulaires, ce qui participe à l'activation des plaquettes pour initier la seconde phase de l'hémostase primaire [112]. En condition physiologique, les cellules endothéliales plus éloignées continuent de présenter à leur surface des protéines anti-thrombotiques, ce qui empêche la dissémination des réactions hémostatiques.

II.1.1.3 La phase plaquettaire

Cette phase se déroule en trois étapes : l'activation plaquettaire, l'adhésion plaquettaire et l'agrégation plaquettaire (Figure 1).

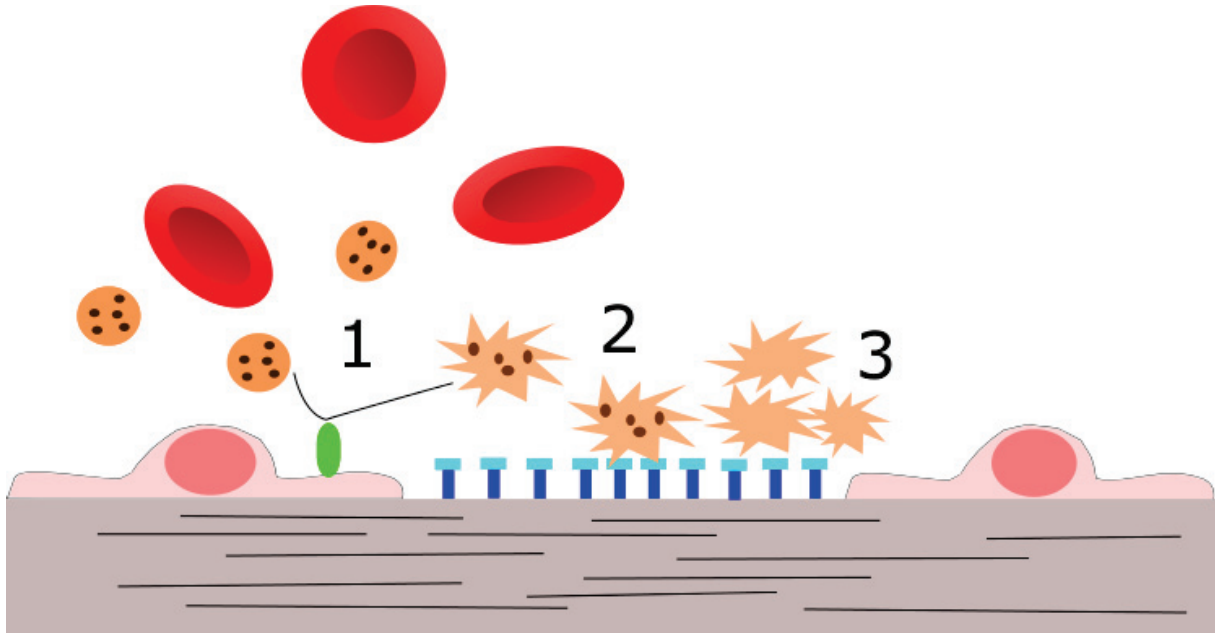


Figure 1 : Phase plaquettaire de l'hémostase primaire. 1 activation plaquettaire. 2 adhésion plaquettaire aux facteurs de von Willebrand présentés par la media et dégranulation des plaquettes. 3 agrégations plaquettaires par l'intermédiaire de la fibrine.

Les plaquettes sont activées, entre autres, par le facteur tissulaire. Suite à leur activation, les plaquettes expriment deux grands types de récepteurs adhésifs, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui adhère à la fibrine et au fibrinogène, et la glycoprotéine Ib-V-IX qui reconnaît et se fixe au facteur de von Willebrand [15, 74, 144].

Les glycoprotéines Ib-V-IX permettent l'adhésion des plaquettes à la zone lésée [23]. Les plaquettes augmentent alors leur surface pour recouvrir au mieux la lésion. Les intégrines permettent, elles, de lier les plaquettes entre elles par l'intermédiaire de la fibrine [8].

Suite à leur activation par les facteurs de vW, les plaquettes sécrètent des molécules, stockées dans les vacuoles α et δ , notamment des facteurs IV, V et VIII et du calcium. Ce phénomène initie l'hémostase secondaire.

II.1.1.4 L'hémostase Secondaire

L'hémostase secondaire est la coagulation au sens strict. La coagulation assure une hémostase plus longue que l'hémostase primaire, de l'ordre de plusieurs heures. Elle est basée sur l'activation d'une cascade de facteurs moléculaires. La nomenclature de ces facteurs est disponible dans le Tableau II.

Comme présenté plus haut, ces facteurs circulent sous forme de zymogène s'activant en cascade. Cette cascade de la coagulation conduit à la création de fibrine à partir de fibrinogène. La fibrine stabilise le clou plaquettaire et, en devenant insoluble, fait coaguler le sang.

Tableau II : Nomenclature des facteurs de la coagulation

Facteur de la coagulation n°	Nom
Facteur I	Fibrinogène
Facteur II	Prothrombine
Facteur III	Facteur tissulaire ou thromboplastine
Facteur IV	Calcium
Facteur V	Proaccélélerine
Facteur VI	Accélélerine (ancien nom du facteur Va)
Facteur VII	Facteur stable, proconvertine
Facteur VIII	Facteur anti hémophilique A
Facteur IX	Facteur anti hémophilique B
Facteur X	Facteur de Stuart-Prower
Facteur XI	Antécédent de la prothrombine plasmatique
Facteur XII	Facteur Hageman
Facteur XIII	Facteur de Laki-Lorand

II.1.1.4.1 Le facteur I

Le facteur I ou fibrinogène est une protéine plasmatique synthétisée principalement par les hépatocytes. Le fibrinogène est formé de deux sous-unités identiques formées elles-mêmes de trois chaînes peptidiques. Le tout est relié par 29 ponts disulfures [116]. Au centre de cette protéine sont présents les fibrinopeptides A et B. Ces fibrinopeptides sont riches en acides aminés électronégatifs (glutamate, aspartate et tyrosine-O-Sulfate), ce qui assure l'hydrosolubilité du fibrinogène et leur répulsion mutuelle.

Par action de la thrombine, les fibrinopeptides sont clivés permettant l'alignement des monomères de fibrine pour former la protofibrille [145]. Enfin la polymérisation conduit à l'accroissement en largeur des fibrilles amenant à la formation de fibres. Toutes les liaisons faibles et ioniques formées sont ensuite renforcées par l'action du facteur XIIIa qui crée des liaisons covalentes entre les divers polymères.

II.1.1.4.2 Le facteur II

Le facteur II ou prothrombine est une protéine plasmatique qui est zymogène de la thrombine. La synthèse de ce facteur s'effectue au niveau des hépatocytes et nécessite la présence de vitamine K. La vitamine K intervient dans les modifications post-traductionnelles au niveau du réticulum endoplasmique pour établir la structure de la molécule par l'intermédiaire des résidus glutamate γ -carboxylés (GLA). Ces GLA permettent la liaison au calcium et aux phospholipides, propriété indispensable pour permettre l'activité du complexe prothrombinase sur la prothrombine. La conversion de la prothrombine en thrombine nécessite la présence de calcium, du facteur Va, du facteur Xa ainsi que du facteur plaquettaire 3, qui forment un complexe appelé prothrombinase.

La thrombine est formée de deux chaînes, une chaîne légère de 36 acides aminés et une chaîne lourde de 259 acides aminés dont la formation est consécutive au clivage de la prothrombine par la prothrombinase. Après activation, la thrombine se détache des phospholipides auxquels elle s'est liée au cours de l'activation de la prothrombine par le facteur Xa.

II.1.1.4.3 Le facteur III

Le facteur III ou facteur tissulaire ou thromboplastine est une molécule potentiellement synthétisée par tous les tissus. Il est surtout présent à la surface des cellules épithéliales, des muqueuses et au niveau de la media et de l'adventice des artères [54, 112]. En cas d'inflammation, les cellules endothéliales peuvent l'exprimer. Enfin, le facteur tissulaire est aussi présent dans la circulation sous forme de microparticule. Ces microparticules sont créées par des cellules à la suite de stimulation ou sont des résidus de cellules apoptotiques [100, 101, 108]. Le facteur III est une glycoprotéine à simple chaîne de 261 ou 263 acides aminés et de poids moléculaire de 45 kDa pour la molécule glycosylée. Le facteur III peut activer le

facteur VII, ce qui est à l'origine de la voie du facteur tissulaire (anciennement appelé voie extrinsèque). L'activité du facteur III est inhibée par une protéine : l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire [61, 131].

II.1.1.4.4 Le facteur IV

Le facteur IV de la coagulation est le calcium circulant sous forme ionique. Il est un élément fondamental de la cascade de la coagulation. En effet, bien qu'il n'active ou n'inhibe pas en lui-même la coagulation, il permet l'activité de certains autres facteurs de la coagulation [118].

II.1.1.4.5 Le facteur V

Le facteur V, aussi appelé proaccélélerine, est une protéine de 330kDa. Il est présent principalement dans le plasma, ainsi que dans les granules α des plaquettes (20 à 25% des facteurs V totaux chez l'homme). Le facteur V plasmatique est synthétisé par le foie. Concernant le facteur V présent dans les plaquettes, il est en partie synthétisé par les mégacaryocytes et en partie absorbé par endocytose, à partir du plasma [176].

Le facteur V a, à la fois, un rôle pro-coagulant et anticoagulant. Le facteur V acquiert son activité pro-coagulante après son activation par protéolyse effectuée sous l'action de la thrombine et du facteur Xa. Le facteur Va participe alors au complexe prothrombinase [157]. Dans sa forme inactivée, le facteur V stimule l'activité protéolytique de la protéine C activée sur le facteur VIIIa [27, 183]. Par cette action, le facteur V a une action anticoagulante. Cette dualité d'action se retrouve dans la symptomatologie liée à un dysfonctionnement de cette protéine, où les patients présentent de l'hémophilie ou de la thrombophilie [127].

II.1.1.4.6 Le facteur VI

Le facteur VI ou accélélerine est l'ancienne désignation du facteur V activé.

II.1.1.4.7 Le facteur VII

Le facteur VII ou proconvertine est une glycoprotéine plasmatique synthétisée au niveau des hépatocytes et sa synthèse post-traductionnelle dépend aussi de la vitamine K. Tout comme le facteur II, le facteur VII possède un domaine GLA (domaine riche en acides γ -carboxyglutamiques) [44]. Son activation est permise par l'action du facteur tissulaire. Cette réaction nécessite la présence de calcium. Le facteur VII peut aussi être activé par les facteurs Xa, IXa et XIIa [114]. Le complexe facteur III – Facteur VIIa est à l'origine d'une auto-activation du facteur VII et de l'activation le facteur X dans la voie du facteur tissulaire[109, 141].

II.1.1.4.8 Le facteur VIII

Le facteur VIII est une glycoprotéine. Il est aussi appelé facteur antihémophilique A. En effet, les personnes ayant une déficience dans ce facteur présentent une hémophilie de type A. In vivo, ce facteur circule lié dans le plasma avec le facteur de von Willebrand [50, 187].

Il est synthétisé au niveau des hépatocytes, mais aussi dans d'autres organes comme la rate ou le rein. La plupart des études considèrent la rate comme l'organe de stockage et de régulation de la concentration plasmatique du facteur VIII [60]. L'activation du facteur VIII est permise par le facteur Xa et la thrombine qui le clive en 3 sites. Ce clivage permet la libération de la partie centrale de 170 kDa et la formation d'un tripeptide actif. Il est à noter que le facteur VIIIa, obtenu par clivage par le facteur Xa, aurait une activité moindre que celui obtenu par la thrombine. Le facteur VIIIa est un cofacteur du facteur IXa, des phospholipides et du calcium pour l'activation du facteur X.

II.1.1.4.9 Le facteur IX

Le facteur IX ou facteur antihémophilique B est une sérine protéase activant le facteur X. Sa synthèse a lieu au niveau des hépatocytes. De plus, le facteur IX nécessite une modification post-traductionnelle vitamine K dépendante. Le facteur IX est clivé par le facteur XIa en une molécule, le facteur IXa. Il peut également être activé par le facteur VIIa ou encore le facteur Xa. Le facteur IX est en compétition avec le facteur X pour le site actif du facteur VIIa.

II.1.1.4.10 Le facteur X

Le facteur X ou facteur Stuart-Prower est une sérine protéase vitamine K-dépendante, synthétisée dans le foie sous forme d'un zymogène. L'activation du facteur X est la première réaction de la voie commune de la coagulation. Le facteur X peut être clivé en facteur Xa : par la voie intrinsèque par l'action du complexe VIIIa-IXa, par la voie du facteur tissulaire par l'action du complexe IIIa-VIIa [57, 75]. Le rôle du facteur Xa est de former, avec le facteur Va, le complexe prothrombinase.

II.1.1.4.11 Le facteur XI

Le facteur XI ou antécédent de la thromboplastine plasmatique est un zymogène glycoprotéique synthétisé par le foie. Il est responsable de l'activation du facteur IX. Il est activé par le facteur XIIIa, la thrombine ou sa propre forme activée. Ainsi le facteur XI est à l'origine de l'amplification de la cascade de la coagulation. Chez l'homme, l'hémophilie C est une maladie due à un déficit en facteur XI [148].

II.1.1.4.12 Le facteur XII

Le facteur XII ou facteur de Hageman initie la voie endogène de la coagulation. En effet, c'est une glycoprotéine zymogène s'activant au contact de charges électro-négatives qui sont nombreuses au niveau de la media vasculaire. Enfin, le facteur de Hageman est aussi un élément clef de l'inflammation. Il participe au système des kinines en clivant la prékallikréine.

II.1.1.4.13 Le facteur XIII

Le facteur XIII ou facteur stabilisant de la fibrine est une transglutaminase formant, une fois activée, des ponts ϵ -(γ -glutamyl)lysine entre les polymères de fibrines. Ces liaisons covalentes augmentent la résistance du polymère à la lyse par la plasmine [135].

L'activation du facteur XIII est favorisée par la thrombine et le fibrinogène.

II.1.1.5 Cascade de la coagulation

La cascade de la coagulation est présentée en Figure 2. Pour déclencher cette cascade, deux voies ont été mises en évidence : la voie endogène et la voie du facteur tissulaire. Ces deux voies se rejoignent en une voie commune. Le facteur X est au croisement de ces deux voies.

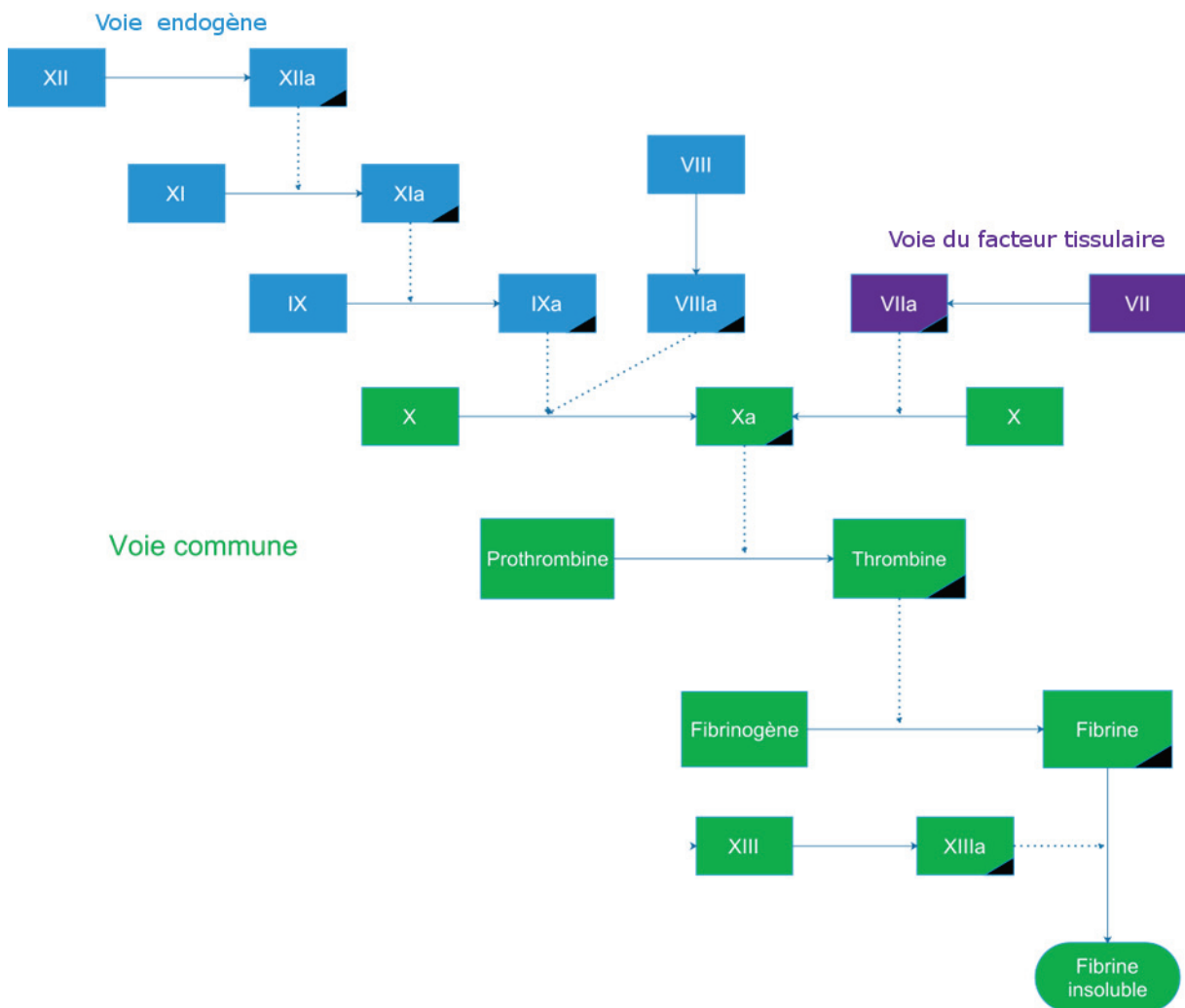


Figure 2 : Schéma simplifié de la cascade de la coagulation

II.1.1.5.1 Voie du facteur tissulaire

La voie du facteur tissulaire est, comme son nom l'indique, activée par le facteur tissulaire. Le facteur tissulaire active le zymogène du facteur VIIa qui active, à son tour, le zymogène du facteur Xa. Cette voie permet l'initiation de la coagulation.

II.1.1.5.2 Voie endogène

L'activation de la voie endogène débute avec le facteur XII activé par le contact avec les couches sous endothéliales électro-négatives. Ce dernier active le facteur XI, lui-même activant le facteur IX. Le facteur IXa peut, en se combinant au facteur VIII, en présence de calcium ionisé et de phospholipides plaquettaires, activer le zymogène du facteur Xa.

Cette voie permet l'auto-entretien de la coagulation. En effet, la thrombine peut aussi activer les facteurs VIII et XI de cette voie.

II.1.1.5.3 Partie commune de la cascade de la coagulation

Comme décrit précédemment, les deux voies se rejoignent avec l'activation du facteur Xa. Ce facteur avec participation du facteur Va, active la prothrombine (facteur II) en thrombine. La thrombine permet la synthèse de polymères de fibrine à partir du fibrinogène. Une seconde réaction, faisant intervenir le facteur XIIIa, transforme la fibrine en fibrine insoluble.

II.1.1.6 L'hémostase Tertiaire

L'hémostase tertiaire est caractérisée par la fibrinolyse et la résolution du clou plaquettaire. Cette réaction, médiée par la plasmine, permet la dégradation de la fibrine en produit de dégradation de la fibrine (PDF), ce qui limite l'extension pathologique de l'hémostase et permet la cicatrisation de la zone lésée.

La plasmine est produite par le clivage protéolytique du plasminogène circulant. Cette réaction est catalysée par deux facteurs activateurs du plasminogène. Le premier est l'activateur tissulaire du plasminogène, il est produit par les cellules endothéliales suite à l'activation de celles-ci par la thrombine ou par une occlusion vasculaire. Le second est le facteur activateur du plasminogène de type urokinase. Il circule comme prourokinase, lors de certaines pathologies ou en cours de gestation [147] et est activé au contact de la plasmine.

II.1.2 Exploration de l'hémostase

En raison de la complexité de l'hémostase, il est difficile d'évaluer la coagulation générale avec un seul test [95]. Ainsi, de nombreuses méthodes ont été développées dans le but d'explorer certaines parties de l'hémostase.

II.1.2.1 Exploration de l'hémostase primaire

II.1.2.1.1 Le temps de saignement

Le temps de saignement évalue l'hémostase primaire *in vivo*. Il consiste à mesurer l'intervalle de temps entre la lésion d'un vaisseau sanguin et l'arrêt du saignement. La lésion vasculaire peut être réalisée à l'aide d'une aiguille ou d'une lame. Il existe deux principales techniques d'évaluation du temps de saignement : l'épreuve de Duke et le test d'Ivy [174]. L'épreuve de Duke consiste en une incision au niveau du lobule de l'oreille et le test d'Ivy en une incision de dimension constante à l'avant-bras. Malgré ces tentatives de standardisation, les temps de saignement sont peu sensibles et peu fiables. Ils sont de moins en moins utilisés [158].

Ces tests renseignent sur les fonctions hémostatiques des vaisseaux et des plaquettes. Ainsi, une augmentation de cette mesure peut révéler une thrombopénie, une thrombopathie, une maladie de von Willebrand, une afibrinogénémie, une anomalie des vaisseaux ou une anémie sévère.

II.1.2.1.2 Numération plaquettaire

La numération plaquettaire est un test sanguin qui consiste à compter le nombre de plaquettes circulantes, il peut être réalisé par des compteurs globulaires automatiques. La réalisation de ce test nécessite un prélèvement sanguin qui est à recueillir dans un tube EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique).

La numération plaquettaire s'effectue en pratique en même temps que le reste de l'hémogramme. Les automates mesurent aussi d'autres paramètres : le thrombocyte (équivalent de l'hématocrite pour les plaquettes) et le volume plaquettaire moyen. Toutefois, un contrôle manuel est à réaliser en complément des valeurs obtenues. En effet, une agglutination des plaquettes est possible. Les agrégats, ainsi formés, sont comptés par l'automate comme une seule entité d'où une sous-estimation thrombocytaire. La numération plaquettaire permet donc la mise en évidence des thrombopénies mais en aucun cas des thrombopathies.

II.1.2.1.3 Tests d'agrégation plaquettaire

Ces tests sont de pratique courante en médecine humaine lors de suspicion de thrombopathie congénitale ou acquise. L'échantillon sanguin est prélevé sur un tube contenant du citrate de sodium. Une première centrifugation légère est réalisée pour séparer les cellules des lignées blanches et rouges du plasma, tout en concernant les plaquettes dans le plasma. Ce plasma est, de nouveau, centrifugé pour obtenir dans le tiers inférieur un plasma riche en plaquettes (PRP) et dans les deux tiers supérieurs un plasma pauvre en plaquettes (PPP). Enfin, l'agrégation plaquettaire est mesurée par photométrie, avec un agrégomètre, après l'ajout d'un agoniste (l'adénosine diphosphate, l'épinéphrine, le collagène, la ristocétine ou encore l'acide arachidonique) au PRP [19]. En effet, un plasma riche en plaquettes non agrégées absorbe plus la lumière qu'un plasma dont les plaquettes sont agrégées. Le PPP sert de référence pour le calcul de l'agrégation plaquettaire.

Dans le but d'améliorer la répétabilité de ce test, le *Clinical and Laboratory Standard Institute* a publié en 2008 des recommandations sur la réalisation de ce test (choix des agonistes, paramètres de centrifugation...) [34].

II.1.2.1.4 Tests de sécrétion plaquettaire

Il est possible d'évaluer la sécrétion des plaquettes et même de différencier la sécrétion des granules α et δ . Dans ce but, la sécrétion de molécules spécifiques à chacune des vacuoles est mesurée. Pour ce qui concerne les vacuoles δ , le test de référence est la mesure de la sécrétion de sérotonine marquée au carbone 14 [79, 123]. En raison des difficultés d'utilisation de matériel radioactif d'autres méthodes ont été développées, notamment le dosage de l'ATP et de l'ADP sécrétés [123]. Concernant les granules α , ce sont les sécrétions du facteur plaquettaire 4 et de la bêta-thromboglobuline qui sont mesurées de préférence par ELISA [123]. Un défaut de sécrétion plaquettaire peut être dû à une anomalie de liaison, de stockage, de métabolisme ou d'exocytose des granules denses.

II.1.2.1.5 Évaluation du facteur de von Willebrand

L'évaluation du facteur de von Willebrand s'effectue en deux étapes. Tout d'abord, la concentration en facteur de von Willebrand est mesurée à l'aide de techniques immunologiques. Une fois le dosage quantitatif effectué, l'activité du facteur de von Willebrand peut être mesurée. Un test estimant la capacité de ce facteur à jouer son rôle de cofacteur de l'agglutination et de l'agrégation plaquettaire a été développé. On utilise alors, un antibiotique glycopeptidique, la ristocétine, qui sert d'activateur exogène du facteur de von Willebrand. L'activité de ce dernier conduit à une agglutination des plaquettes. L'agglutination des plaquettes est alors mesurée avec un agrégomètre.

II.1.2.2 Exploration de l'hémostase secondaire

II.1.2.2.1 Le temps de Quick

Le temps de Quick (TQ) est un test couramment utilisé. Il permet d'explorer la voie du facteur tissulaire de la coagulation. Le TQ est réalisé en ajoutant du calcium et de la thromboplastine au plasma citraté du patient. Ces deux éléments permettent d'activer le facteur VII, et ainsi la voie du facteur tissulaire. Le TQ correspond au temps entre l'ajout de la thromboplastine et la coagulation du plasma.

La mesure du temps de Quick comporte une grande variabilité pouvant rendre difficile la comparaison des TQ entre deux laboratoires. Une grande partie de cette variabilité est due à la capacité de réaction de la thromboplastine qui peut être différente entre deux thromboplastines. Cette capacité peut être mesurée en calculant l'indice de sensibilité international (ISI) de la thromboplastine. La sensibilité d'une thromboplastine augmente quand son ISI diminue. Ainsi, pendant les années 1980, la plupart des laboratoires européens utilisaient des thromboplastines ayant des ISI de 1 à 1.4 pour réaliser les tests, tandis qu'aux États-Unis, la thromboplastine utilisée était beaucoup moins sensible (ISI de 1.8 à 2.8). Ces différences ont provoqué une difficulté à trouver un consensus sur les valeurs cibles recommandées. C'est pourquoi un autre modèle d'expression des résultats, l'international normalized ratio (INR), a été mis en place en 1982 et adopté par l'ensemble des pays. Il permet une standardisation des tests en autorisant la comparaison des mesures, malgré les différences de thromboplastine.

L'INR est défini comme étant le rapport du temps de Quick du malade sur celui d'un témoin (moyenne géométrique du temps de Quick d'une trentaine de plasmas normaux), élevé à la puissance ISI. L'expression du temps de Quick permet ainsi de minimiser la variabilité interlaboratoire.

$$INR = \left(\frac{TQ \text{ malade}}{TQ \text{ témoin}} \right)^{ISI}$$

La surveillance biologique d'un traitement par les AVK repose donc aujourd'hui uniquement sur la mesure de l'INR [9]. Chez le sujet sain non anticoagulé, l'INR est voisin de 1. Il s'élève proportionnellement au degré d'hypocoagulabilité. Pour la majorité des indications, la zone thérapeutique est définie par un INR entre 2 et 3 [9]. Au-delà de 5, le risque hémorragique est extrême.

II.1.2.2.2 Le temps de céphaline kaolin ou temps de thrombine partiellement activée

Ce test, similaire au temps de Quick, permet d'explorer la voie endogène et commune de la coagulation. La voie endogène est activée par l'ajout dans le plasma d'un mélange de CaCl_2 , de céphaline et d'un agent activateur du système contact, le kaolin. Les céphalines sont des phospholipides du cerveau qui possèdent une action procoagulante, similaire à celle des plaquettes. Le kaolin (activateur particulaire) est l'une des molécules les plus couramment utilisées comme activateur du système de contact. Le type de céphalines utilisé jouerait également un rôle dans la sensibilité du test. Ainsi comme pour le temps de Quick le temps de céphaline kaolin dépend grandement des réactifs employés ce qui limite les comparaisons inter-laboratoires.

II.1.2.2.3 La thromboélastographie/thromboélastométrie

La thromboélastographie est un test global de la coagulation. Il a été mis au point en 1948 par Hartert [72]. Ce test simule le flot sanguin et permet d'évaluer les différents paramètres de l'initiation, de la formation, de la stabilisation et de la dégradation d'un caillot sanguin [105]. Cette technique fut très utilisée au début de la seconde moitié du vingtième siècle, avant d'être progressivement abandonnée. Dans les années 1980, de nombreuses innovations techniques, notamment l'invention de la thromboélastométrie rotative, ont permis son utilisation en clinique et ont contribué à un regain d'intérêt pour cette technique.

Le thromboélastogramme (Figure 3) est la représentation graphique du caillot par rapport au temps. Plusieurs paramètres sont mesurés à partir de cette représentation graphique (Tableau III)

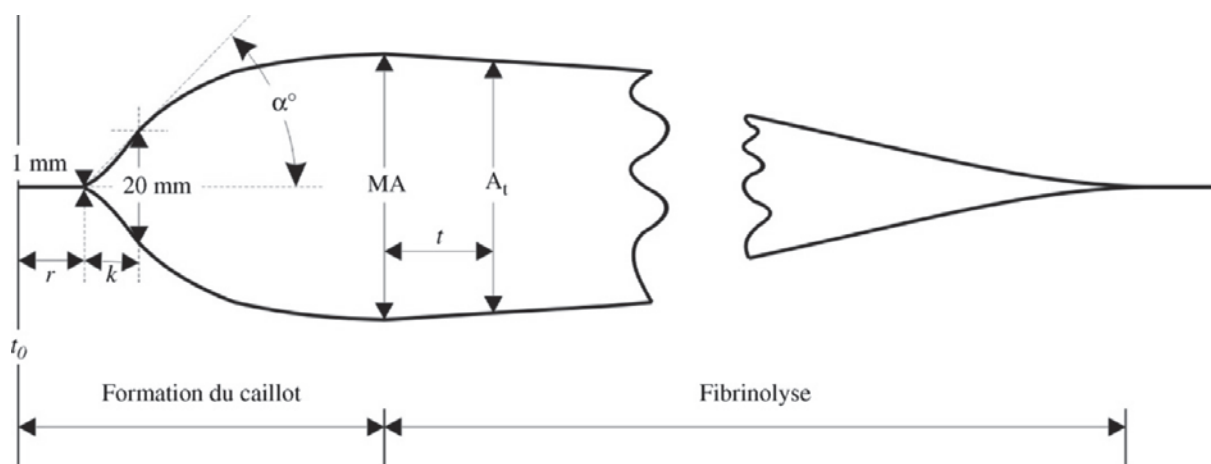


Figure 3 : Représentation graphique d'un thromboélastogramme d'après [151].

Tableau III : Nom des différents paramètres et leur signification dans le système TEG et ROTEM [151].

Nom du paramètre TEG	Nom du paramètre ROTEM	Signification
R	CT	« temps de réaction », exprimé en mm (TEG) ou seconde (ROTEM), il représente la mesure du segment entre le temps 0 et l'endroit où les deux branches du diagramme se séparent distinctement (i.e. 1 mm)
k	CFT	« temps de formation du caillot », il équivaut à la distance (ou au temps) entre r (ou CFT) et un écartement de 20 mm des deux branches. Cette valeur de 20 mm a été choisie arbitrairement par Hartert comme correspondant à l'écartement maximal obtenu avec un plasma normal privé de plaquettes.
MA	MCF	elle correspond à la solidité maximale atteinte par le caillot au cours de la mesure c'est-à-dire la plus grande amplitude du thromboélastogramme, exprimé en mm.
A	α	exprimé en degré, il correspond à la pente du tracé depuis r jusqu'à k.
CLI	LI	« indice de lyse du caillot », exprimé en %, il correspond au rapport entre l'amplitude du caillot à t minutes (A_t) sur l'amplitude maximale (MA/MCF).

De même que pour les temps de coagulation, il est possible d'explorer préférentiellement une ou l'autre des voies de la coagulation selon le réactif utilisé. De plus, ce test se faisant sur sang total, il est aussi possible d'évaluer l'influence des plaquettes sur la coagulation.

Il est à noter que la lyse du caillot est rarement évaluée [151]. De plus, l'intérêt de cette technique est actuellement débattu, certains la présentant comme une technique d'avenir pour l'évaluation de la coagulation alors que d'autres mettent en avant le fait que, jusqu'à présent, elle n'a pas montré un avantage significatif par rapport aux méthodes traditionnelles (Temps de coagulation) [2].

II.1.2.2.4 Le test de génération de thrombine

Le test de génération thrombine mesure le potentiel d'un plasma à générer de la thrombine après activation de la coagulation *in vitro* par du facteur tissulaire ou un autre déclencheur [46]. Ce test a été décrit pour la première en 1953 par deux équipes, l'une sur sang total (non utilisé actuellement) et l'autre sur plasma [107, 136]. La formation de la thrombine dans le plasma est suivie par fluorescence [28].

Ce test génère une courbe de coagulation qui permet d'évaluer à la fois les facteurs pro-coagulants et les facteurs anticoagulants (Figure 4). De même, comme pour la thromboélastométrie, le test de génération de thrombine permet d'analyser également la phase de propagation (où une grande quantité thrombine est générée par des boucles de rétroaction sur les facteurs V, VIII et XI) et la phase de terminaison [46]. De la courbe, sont extraits quatre paramètres : le « lag time », temps avant le début de formation de thrombine ; le « time to peak », temps d'obtention du pic de génération ; le « peak », la concentration maximale de thrombine formée et l'« ETP » qui est l'aire sous la courbe [96].

De même que pour la thromboélastométrie, le test de génération de thrombine manque encore de standardisation [46].

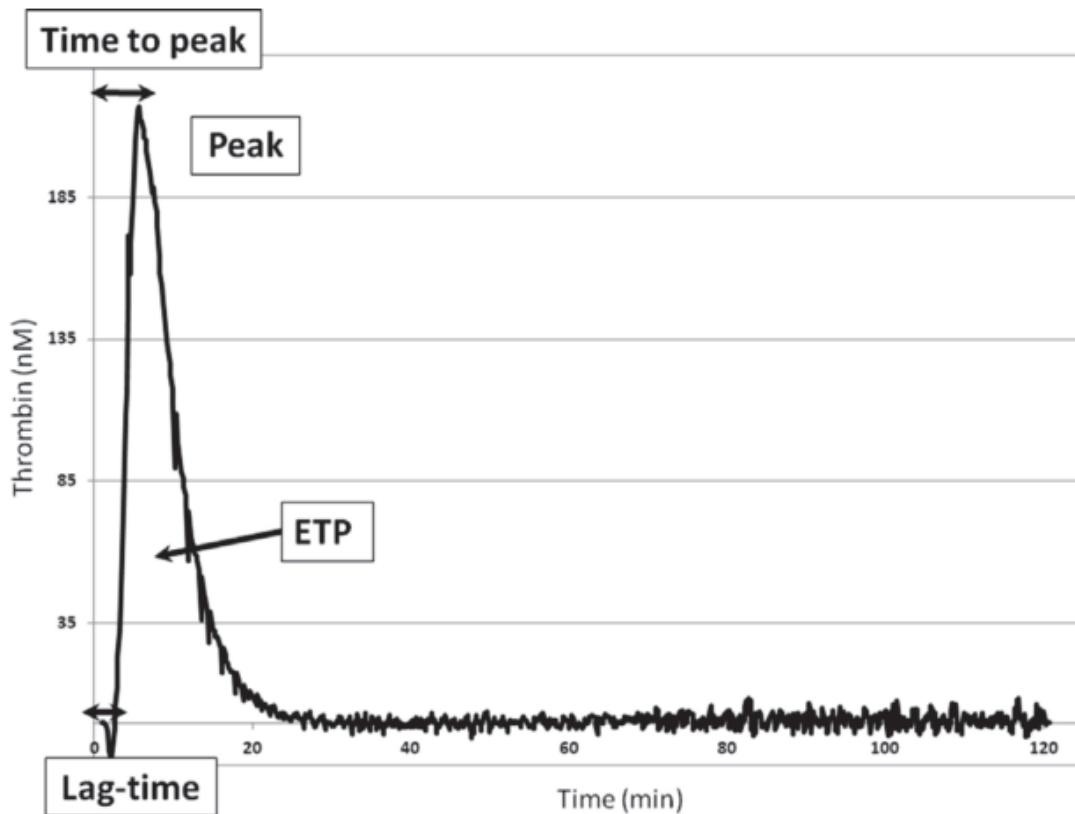


Figure 4 : courbe de résultat d'un test de génération de thrombine et ses principaux paramètres.

II.1.2.2.5 Dosage des facteurs de la coagulation

Afin d'évaluer l'efficacité de la coagulation, il est aussi possible de doser les facteurs de la coagulation eux-mêmes. Nous présenterons ici les méthodes de dosage des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants par un substrat chromogène.

Le principe du dosage est le même pour les quatre facteurs vitamine K dépendants. Il consiste en l'activation du facteur à doser. Puis, à utiliser la capacité enzymatique de ce facteur pour enclencher une cascade réactionnelle menant au clivage d'un substrat chromogène spécifique (exemple de cascade pour le dosage du facteur VII dans la Figure 5). Le clivage conduit à la libération p-nitroaniline (nPA) dont la concentration peut être mesurée par densité optique (longueur d'onde 405nm). Des facteurs de coagulation sont ajoutés avec les réactifs de façon à ce que l'activation du facteur dosé soit l'étape limitante.

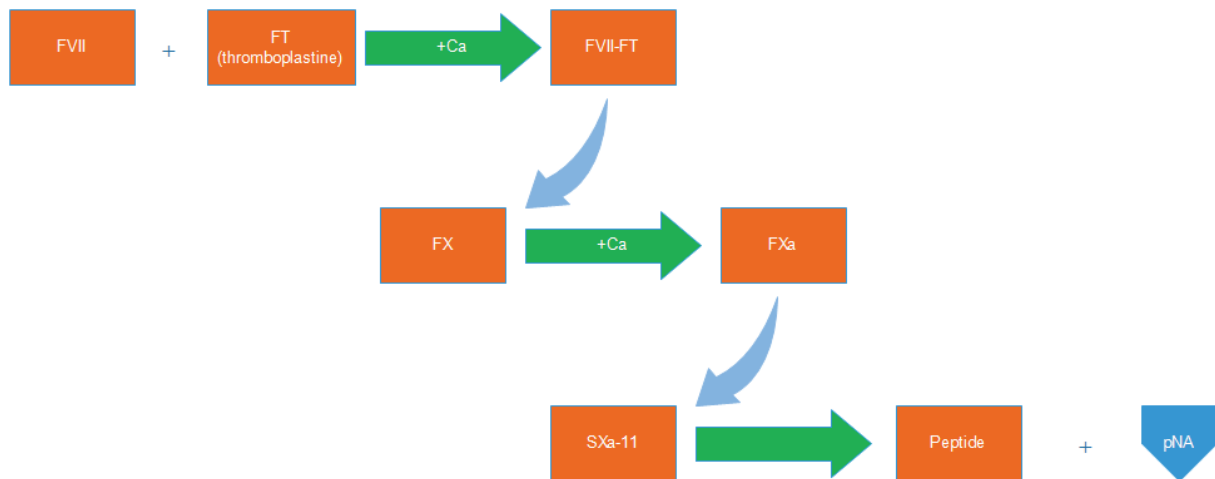


Figure 5 : Schéma de la cascade de réaction aboutissant à la formation de p-nitroaniline à partir de SXa-11 (substrat chromogène spécifique du facteur X activé) permettant la quantification du facteur VII.

Cette technique permet de doser uniquement les formes activables des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants, à l'exception du dosage de la prothrombine. En effet, dans ce cas le réactif utilisé, l'écarine, transforme indifféremment la prothrombine γ -carboxylée et celle qui ne l'est pas, en meizothrombine, pouvant cliver le substrat spécifique [21]. Une solution pour doser uniquement la forme γ -carboxylée de la prothrombine est d'utiliser une modification du temps de Quick. Dans cette version, le temps de Quick est mesuré à partir d'un plasma à doser qui est dilué dans un plasma dépourvu de prothrombine. Ainsi le facteur limitant de la réaction est la concentration de prothrombine du plasma test. Ainsi, le temps de Quick modifié est inversement proportionnel à la concentration du plasma en prothrombine.

II.1.2.3 Exploration de l'Hémostase tertiaire

II.1.2.3.1 Test de von Kaulla

Le test de von Kaulla consiste à faire précipiter en milieu acide les euglobulines du plasma citraté (les facteurs de coagulation, le plasminogène, le fibrinogène et l'activateur tissulaire du plasminogène vasculaire de la fibrinolyse) afin de former un caillot et de séparer les activateurs de la fibrinolyse (présent dans le précipité) des inhibiteurs (présent dans le surnageant). On observe alors la formation d'un caillot. On mesure alors la vitesse de lyse du caillot, après activation de la fibrinolyse par l'ajout de CaCl₂ qui active l'activateur du plasminogène et donc la fibrinolyse. On évalue ainsi, le temps de lyse du caillot, soit, le temps que met le milieu gélifié à se liquéfier complètement. L'intérêt de ce test est de prendre en compte uniquement les activateurs de la fibrinolyse.

II.1.2.3.2 Dosage du plasminogène

Le dosage du plasminogène est effectué par une technique amidolytique : le plasminogène est activé par la streptokinase (SK) en excès et la plasmine générée est mesurée avec un substrat spécifique chromogène dont l'un des produits sera mesuré par densité optique.

II.1.2.3.3 Dosage du fibrinogène

Le dosage du fibrinogène peut être réalisé par une méthode chronométrique dit de von Clauss utilisant une modification du temps de thrombine pour la détermination quantitative du fibrinogène plasmatique. Le plasma étudié est dilué dans un plasma dénué de fibrinogène, de façon à ce que le fibrinogène soit le facteur limitant. Ainsi, le temps de coagulation du plasma est proportionnel à la concentration en fibrinogène.

II.1.2.3.4 Dosage des produits de dégradation de la fibrine, les d-dimères

Il existe de nombreuses méthodes de mesure des produits de dégradation de la fibrine (PDF) dans le plasma. Elles sont principalement basées sur la reconnaissance immunologique des fragments peptidiques. La technique la plus utilisée est une méthode par agglutination de particules de latex sensibilisées avec des anticorps anti-PDF.

II.2 LES VITAMINES K ET LEURS ACTIONS

II.2.1 Les vitamines K

La première description de la vitamine K a été faite par le biologiste Karl Henrick Dam. Il avait remarqué un déficit dans la coagulation des poulets faisant suite à une alimentation sans cholestérol. En 1935, le rôle du cholestérol dans la coagulation sera infirmé par ce même Karl Henrick Dam, au profit d'un composé liposoluble qu'il nommera vitamine K pour *koagulation*. Par la suite, différentes vitamines K furent isolées [38]. Ses découvertes valurent au Dr H. Dam le prix Nobel en 1943. Cependant, ce n'est que dans les années 70 que le rôle de la vitamine K, dans les modifications post-traductionnelles des protéines vitamine K dépendantes, fût décrit [171]. Par la suite, de nombreux autres rôles de la vitamine K furent décrits notamment dans le métabolisme osseux, ces rôles sont développés dans le chapitre II.2.5 [184]. Le Tableau V cite les protéines vitamine K dépendantes et leur(s) fonction(s) [52].

II.2.2 Propriétés physico-chimiques

Le terme vitamine K regroupe plusieurs molécules qui peuvent être classées en trois sous-types. Toutes les vitamines K contiennent une quinone dérivée du naphthalène, le noyau naphthoquinone substitué en position 2 par un groupement méthyl et d'une chaîne carbonée en position 3 plus ou moins saturée. Les sous-types de vitamine K sont définis par la présence, la longueur et la saturation de la chaîne carbonée présente à la position 3 (Figure 6).

- La vitamine K₁, ou phylloquinone, présente un groupement phytyl en tant que chaîne carbonée. C'est la première vitamine K découverte, elle est utilisée comme médicament.
- La vitamine K₂, ou ménaquinone n (n est le nombre de résidus prényl), est définie par une chaîne latérale comprenant une séquence, plus ou moins longue, de résidus prényls. Ainsi, la ménaquinone 4 (MK 4) possède une chaîne composée de quatre résidus prényls et la MK 6 en possède six.
- La vitamine K₃, ou ménadione, est la plus simple des vitamines K. En effet, elle ne présente pas de chaîne carbonée.

Les vitamines K sont des cofacteurs de réaction d'oxydoréduction.

Les vitamines K sont des éléments liposolubles, thermorésistants, mais sensibles à la lumière. On remarque que la longueur de la chaîne carbonée joue un rôle important dans la lipophilie (Tableau IV), évaluée par le logP. Plus le logP est grand plus la molécule est lipophile.

Tableau IV : Valeur logP de quatre vitamines K.

Nom de la molécule	Nombre d'atomes de carbone de la chaîne latérale	logP
Phylloquinone (vitamine K ₁)	20	9,3
Ménaquinone 4 (vitamine K ₂)	20	8,5
Ménaquinone 7 (vitamine K ₂)	35	14
Ménadione (vitamine K ₃)	0	2,2

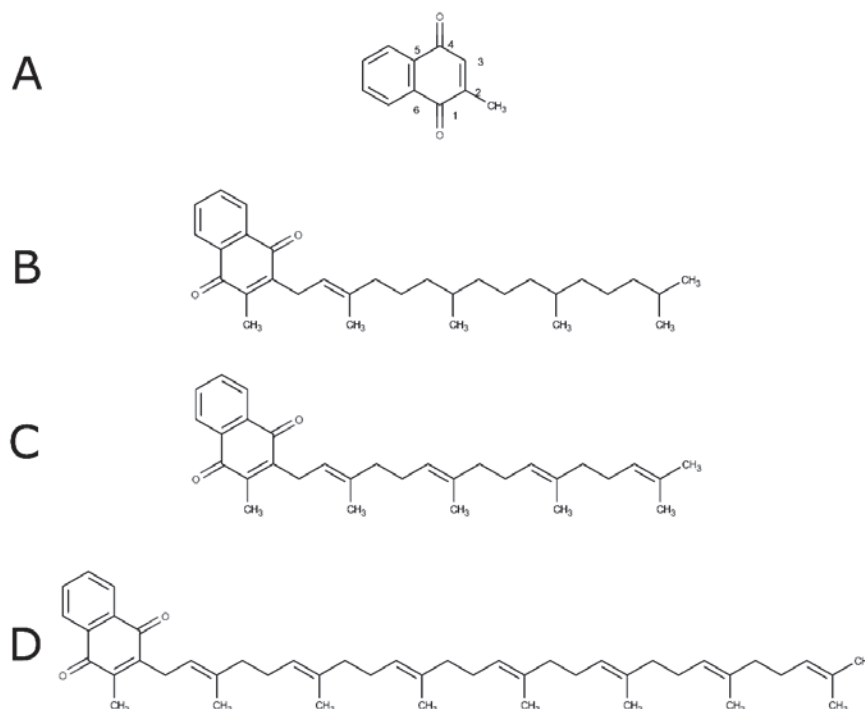


Figure 6 : Structure des différentes classes de vitamine K. (A) Ménadione (vitamine K₃) avec numérotation des atomes de carbone du cycle d'intérêt. (B) Phylloquinone (vitamine K₁). (C) Ménaquinone 4 (vitamine K₂). (D) Ménaquinone 7 (vitamine K₂).

II.2.3 Disponibilité dans l'environnement

Les vitamines K sont présentes dans l'alimentation. La vitamine K₁ est synthétisée par les plantes, les légumes verts sont les principaux fournisseurs de phylloquinone [143, 192]. Les différentes vitamines K₂ sont principalement synthétisées par les bactéries [16]. De plus, les mammifères peuvent aussi convertir la phylloquinone en ménaquinone 4 [128]. Par conséquent, les vitamines K₂ sont principalement présentes dans les denrées issues de la fermentation ou dans les graisses animales. Certaines ménaquinones sont aussi produites par la flore intestinale commensale [35, 99]. Malgré la diversité des apports, les quantités de vitamine K présentes dans l'alimentation sont insuffisantes pour couvrir les besoins physiologiques des mammifères. La majeure partie de la vitamine K des mammifères est recyclée après utilisation.

II.2.4 Pharmacocinétique

II.2.4.1 Absorption

Comme la plupart des lipides, l'absorption de la vitamine K dans l'intestin est dépendante de la formation de micelles [160]. Les micelles sont composées de lipides, dont certains sont issus de la lipolyse pancréatique, ainsi que de sels biliaires. Ce sont les sels biliaires, par leurs propriétés amphotères, qui induisent la formation des micelles et donc la solubilisation des corps hydrophobes.

Les micelles sont ensuite présentées au niveau de la membrane apicale des entérocytes, où les différents lipides sont absorbés dans les entérocytes par la médiation de transporteurs protéiques [84]. Actuellement le transporteur protéique de la vitamine K n'est pas clairement identifié [142], mais de récentes études tendent à montrer qu'un transporteur du cholestérol, la protéine Niemann-Pick C1-like 1, serait impliquée dans l'absorption de la vitamine K [178].

L'absorption de la vitamine K est principalement effectuée au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle [78]. Elle est aussi très dépendante de la composition du bol alimentaire. Un bol alimentaire gras favorise la formation de micelles et l'absorption de la vitamine K [62].

II.2.4.2 Diffusion

Les entérocytes intègrent la vitamine K dans les chylomicrons. Après action des lipoprotéines-lipases plasmatiques (LPL), les chylomicrons restants sont adressés au foie par les apoprotéines. La vitamine K est alors internalisée par les hépatocytes. Une autre partie de la vitamine K est distribuée à d'autres tissus directement par les chylomicrons ou indirectement après passage par le foie [160].

Après métabolisation, la vitamine K est principalement stockée sous forme de ménaquinone 4. Contrairement à la plupart des autres vitamines, les vitamines K sont faiblement présentes dans la circulation sanguine ou les tissus.

II.2.4.3 Métabolisme

[Nonobstant le cycle de la vitamine K traité plus loin]. Les différentes formes de vitamines K peuvent subir des transformations. Actuellement, deux types de conversion sont décrits chez les mammifères, tous deux entraînent la formation de ménaquinone 4, soit à partir de la phylloquinone, soit à partir de la ménadione. Ces conversions permettraient de stocker une partie de la vitamine K. Ces conversions ne semblent pas être tissu spécifique et sont médiées par l'enzyme UBIAD1. Cette enzyme clive la chaîne carbonée de la phylloquinone pour former une ménadione qui est ensuite prénylée par la même enzyme pour former une ménaquinone 4 [43, 125, 180].

II.2.4.4 Élimination

L'élimination de la ménadione ne nécessite pas de métabolisation préalable, elle est éliminée par voie urinaire [180]. Concernant la phylloquinone et les ménaquinones, deux métabolites sont principalement formés dans le foie après raccourcissement de la chaîne carbonée : l'acide K1 et l'acide K2. Les métabolites sont, ensuite, éliminés par voie urinaire et biliaire [43].

II.2.5 Modes d'action des vitamines K et protéines vitamine K dépendantes

Dans les années 1970, le Professeur Stenflo remarqua que, suite à une administration de dicoumarol (un anticoagulant anti-vitamine K) chez les bovins, leur plasma contient une prothrombine anormale [166]. Par la suite, il caractérisa les principales différences de conformation et de composition entre la prothrombine normale et la prothrombine anormale [167–169, 172] ainsi que leur pouvoir respectif d'interaction avec les ions calcium [173]. Cette liaison aux ions Ca^{2+} joue un rôle central dans la liaison des protéines vitamine K dépendantes aux lipides membranaires et dans l'accomplissement de leurs fonctions physiologiques. En effet, ce « pont » formé à partir d'un ion calcium

En résumé, le Professeur Stenflo découvrit que l'activité de la prothrombine est liée à sa capacité d'interagir avec le calcium, que cette propriété nécessite la gammacarboxylation des acides aminés glutamates en acide carboxyglutamiques [170, 171] et que cette transformation est dépendante de la vitamine K. La réaction de gammacarboxylation est présentée en détail dans le chapitre II.3.6.

Par la suite, d'autres protéines vitamine K dépendantes ont été décrites (Tableau V).

Tableau V: Protéines vitamines K dépendantes et leurs fonctions [52]

Protéine vitamine K dépendante	Fonction
Coagulation sanguine	
Prothrombine	Procoagulant
Facteur VII	Procoagulant
Facteur IX	Procoagulant
Facteur X	Procoagulant
Protéine C	Anticoagulant
Protéine S	Anticoagulant
Protéine Z	Anticoagulant
Métabolisme osseux	
Osteocalcine	Régulateur négatif de la croissance osseuse, régulateur du métabolisme énergétique
Protéine matricielle Gla	Inhibiteur de la calcification
Autres fonctions	
Gas 6 et la protéine S	Différenciation, prolifération, adhésion et chemotaxis cellulaire; protection contre la phagocytose et l'apoptose.
Protéine transmembranaire Gla	Non déterminé
Gla-rich protein	Régulation du calcium extracellulaire
Périostine	Migration cellulaire et angiogenèse
Transthyrétine	Ligand des hormones thyroïdiennes et des protéines liées au rétinol

II.2.5.1 Les protéines vitamine K dépendantes dans le métabolisme osseux

II.2.5.1.1 Ostéocalcine

L'ostéocalcine (OC) est une protéine de la matrice osseuse. Elle est sécrétée exclusivement par les ostéoblastes, dont elle est la protéine non-collagénique la plus abondamment sécrétée [73]. Cette PVKD compte 49 acides aminés et son domaine Gla compte 3 acides glutamiques. La gamma-carboxylation de ces derniers augmente l'affinité de l'OC pour les calciums de l'hydroxyapatite de l'os. Il est à noter que le domaine Gla de l'OC n'a pas autant d'affinité pour les ions calcium que celui des autres PVKD. Bien que son rôle structural soit fortement supposé, les souris *oc*^{-/-} présentent une augmentation de leur croissance osseuse [41]. Ainsi, le rôle précis de l'ostéocalcine dans la matrice osseuse est encore en débat. De plus, l'ostéocalcine aurait un rôle dans la maturation osseuse [20]. La forme non-gamma-carboxylée, produite par les ostéoblastes, ou libérée de l'os par l'action des ostéoclastes, présente aussi une activité. Cette forme de l'ostéocalcine est circulante et intervient dans l'homéostasie du glucose [53, 102]. Elle stimule la sécrétion d'insuline par les cellules béta des îlots de Langerhans du pancréas. Elle stimule également la sécrétion d'adiponectine qui augmente la sensibilité du tissu adipeux à l'insuline. Enfin, l'ostéocalcine a aussi une action sur la fertilité masculine en stimulant la sécrétion de testostérone [129].

II.2.5.1.2 Protéine matricielle Gla

La protéine matricielle Gla ou matrix gla protéine (MGP) fut décrite pour la première fois en 1983, par Price [139]. La protéine possède 9 résidus glutamates mais seulement cinq peuvent être gamma-carboxylés afin d'activer la protéine. Elle est principalement sécrétée par les cellules musculaires lisses vasculaires. La transcription de la MGP est régulée positivement par la vitamine D3 et négativement par l'acide rétinoïque [56]. Cette protéine a un rôle majeur dans l'inhibition de la calcification des tissus mous, notamment des vaisseaux sanguins [29]. Son action dans l'inhibition de la calcification a été démontrée grâce par Price, en administrant de fortes doses d'anti-vitamine K à des rats. Ceux-ci ont alors présenté une calcification importante des cartilages [140].

Les animaux déficients en MGP^{-/-} meurent dans les six à huit semaines après la naissance, en raison de la calcification des lamelles élastiques dans la média, entraînant la rupture des grandes artères [106].

II.2.5.2 Les protéines vitamine K dépendantes hors du métabolisme osseux

II.2.5.2.1 Gas 6 et la protéine S

La protéine Gas6 (Growth arrest specific gene 6) est une protéine vitamine K dépendante possédant une forte homologie avec la protéine S. Ces deux protéines activent les récepteurs TAM (pour TYRO3, AXL, MER) qui sont des récepteurs à tyrosine kinase [17]). L'inactivation de ces 3 types de récepteurs TAM conduit à chaque fois, à la dérégulation du processus de phagocytose, entraînant des anomalies fonctionnelles diverses. Il en découle que la régulation de la phagocytose serait le dénominateur commun par lequel Gas6 et la protéine S réguleraient un grand nombre de processus physiologiques, tels que : la différenciation, la prolifération, l'adhésion et le chemotaxis cellulaire ainsi que protection contre la phagocytose et l'apoptose. La protéine S a aussi une fonction anticoagulante.

II.2.5.2.2 Gla Rich Protein

La Gla Rich Protein (GRP) contient 16 résidus glutamates. Tout comme la MGP, elle est associée au dépôt calcique, ce qui laisse présumé de son rôle dans la calcification [185]. Cependant, son fonctionnement précis n'est pas connu.

II.2.5.2.3 Periostine

La périostine est une protéine de la matrice extracellulaire. Elle peut interagir avec les intégrines cellulaires et permettre la mobilité cellulaire et l'angiogenèse. Elle est notamment une protéine importante du développement et de la cicatrisation [66]. La périostine aurait aussi un rôle dans la minéralisation [37]. Cependant, bien que la périostine présente des sites pouvant être gammacarboxylés, il n'est pas certain, actuellement, que ce soit une protéine vitamine K dépendante [10].

II.2.5.2.4 Transthyrétine

La transthyrétine est une protéine homotétramérique de transport des hormones thyroïdiennes et des protéines liées au rétinol. Ce n'est que récemment qu'elle a été classée comme protéine vitamine K dépendante [55].

II.2.6 Recyclage des vitamines K

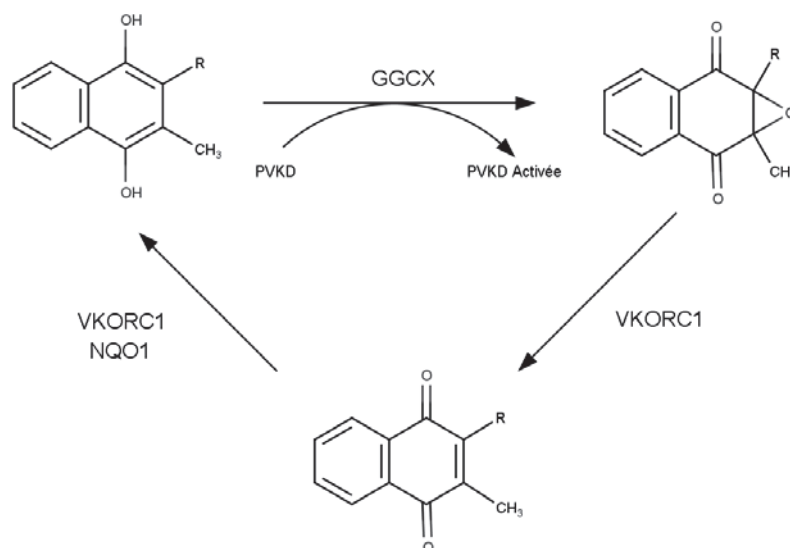


Figure 7 : Cycle de la vitamine K. VKORC1 : vitamine K époxyde réductase complexe 1 ; NQO1 : NADPH quinone-oxydoréductase 1 ; GGCX : Gamma glutamyl carboxylase ; PVKD : Protéine vitamine K dépendante.

La vitamine K est au cœur d'un cycle qui peut être divisé en deux phases : (i) l'utilisation de la vitamine K pour la gamma-carboxylation des résidus glutamates (ii) puis sa régénération (Figure 7). Ce cycle permet de maintenir une quantité suffisante de vitamine K, malgré la faible teneur en vitamine K des aliments, et fait que les carences en vitamine K sont relativement rares [160].

II.2.6.1 La gamma-carboxylation des résidus glutamates

Les protéines vitamine K dépendantes nécessitent une activation par la transformation de leurs résidus glutamates (Glu) en acides carboxyglutamiques (Gla) afin de pouvoir chélater le calcium. Cette réaction est médiée par l'enzyme gamma glutamyl carboxylase (GGCX) et nécessite de la vitamine K sous forme réduite (ou vitamine K hydroquinone) comme cofacteur. Cette réaction schématisée dans la Figure 8 consomme une vitamine K hydroquinone, pour chaque gamma-carboxylation d'un résidu glutamate, en la transformant en vitamine K-2, 3-époxyde [146]. Cette transformation est réalisée dans le réticulum endoplasmique avant la libération des protéines vitamine K dépendantes dans la circulation sanguine [80].

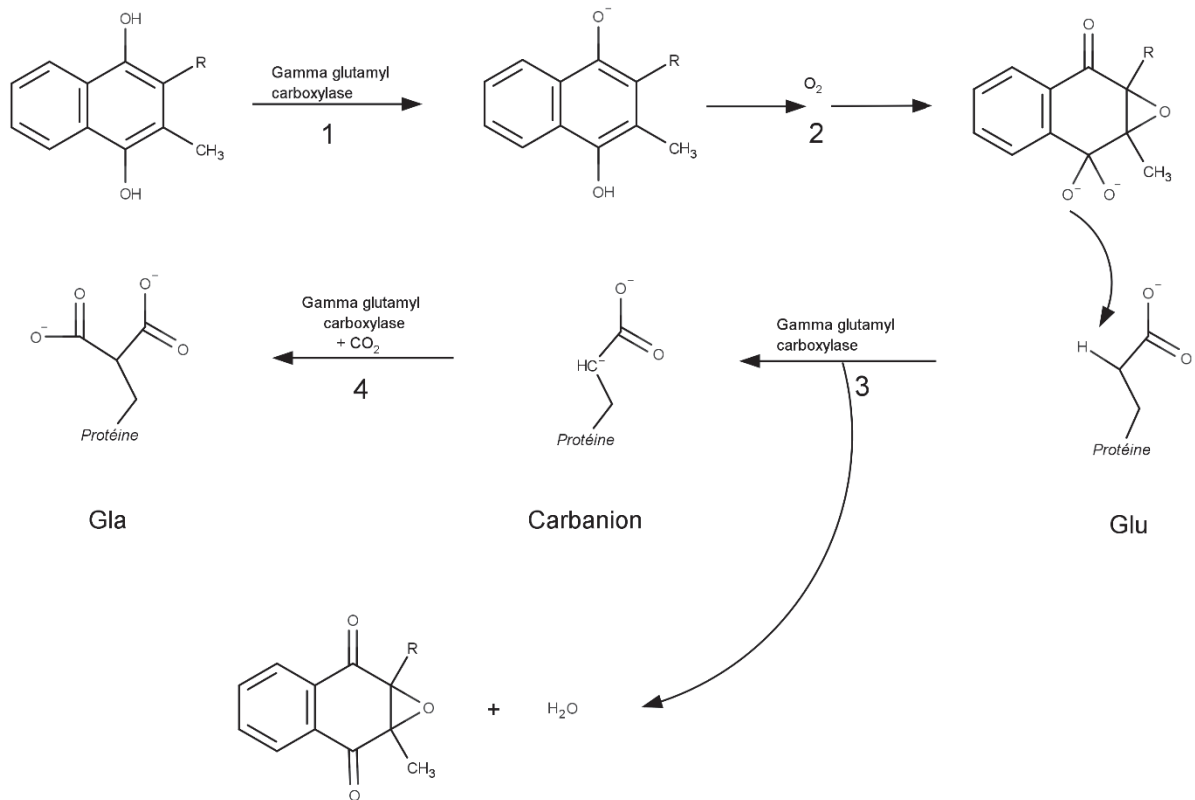


Figure 8 : Schéma de la réaction de γ -carboxylation médiée par l'enzyme gamma glutamyl carboxylase (GGCX). 1) un proton est arraché par GGCX à la vitamine K réduite. 2) Oxygénation de la vitamine K et formation d'une base forte intermédiaire. 3) Transformation du résidu glutamate en carbanion ; formation de H_2O et de la vitamine K-2, 3-époxyde. 4) Carboxylation et formation du résidu acide carboxyglutamique.

II.2.6.2 La régénération de la vitamine K hydroquinone.

La régénération de la vitamine K hydroquinone se fait en deux étapes : passage de la vitamine K-2,3-époxyde en vitamine K quinone (Figure 9) puis de la vitamine K quinone en vitamine K hydroquinone. La seconde réaction doit aussi être réalisée sur la vitamine K d'origine alimentaire qui est sous forme quinone.

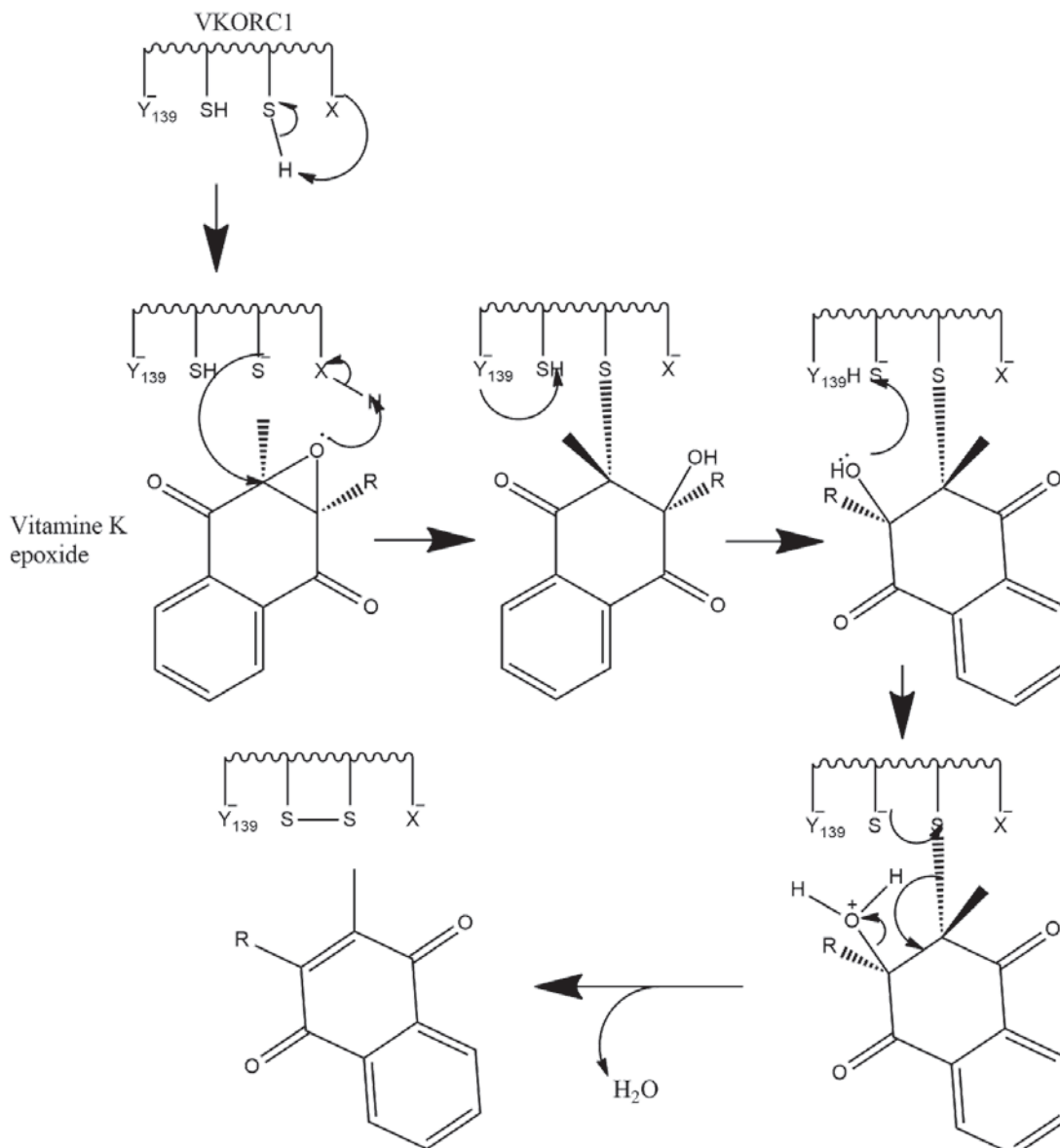


Figure 9 : Schéma du mécanisme permettant la transformation de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone, proposé par Matagrin et al. [115].

Ces deux réactions sont réalisées principalement par la vitamine K époxyde réductase complexe sous unité 1 (VKORC1) et la vitamine K époxyde réductase complexe sous unité 1 like 1 (VKORC1L1). Une étude semble montrer que la VKORC1 est plus efficace que la VKORC1L1 [190]. De plus, les deux enzymes ne sont pas exprimées de façon égale dans tout l'organisme. La VKORC1 est plus exprimée dans le foie que la VKORC1L1, alors que dans les tissus extrahépatiques, les niveaux d'expression des deux enzymes sont beaucoup plus proches [67]. Il semble que le même site catalytique puisse réaliser les deux réductions. La réaction de réduction de la vitamine K quinone en vitamine K hydroquinone peut aussi être médiée par l'enzyme NQO1. Cette enzyme n'est pas sensible aux AVK et permettrait la transformation de la vitamine K quinone utilisée comme antidote en vitamine K hydroquinone.

II.2.6.3 Topologie des enzymes VKORC1 et VKORC1 L1

Les topologies de VKORC1 et de VKORC1 L1 et leurs implications dans le fonctionnement de l'enzyme et dans les résistances aux inhibiteurs sont discutées dans le chapitre II.3.6.

II.3 LES ANTI-VITAMINES K

II.3.1 Historique

L'effet des anti-vitamines K a été observé pendant longtemps, suite à l'empoisonnement de bovins au « mélilot gâté », donnant une maladie hémorragique [7, 65, 83]. En effet, le mélilot (*Melilotus officinalis*), couramment utilisé comme fourrage, contient de la coumarine qui, avec la fermentation du mélilot, devient du dicoumarol, un anticoagulant anti-vitamine K [83]. Le dicoumarol est synthétisé, à visée anticoagulante, pour la première fois en 1941 [134]. Dans les années suivantes, le même chercheur synthétise le coumafène (ou warfarine) [119] qui reste encore aujourd'hui, l'un des anticoagulants les plus utilisés en médecine humaine [71].

Plus récemment, suite aux résistances émergentes dans la population de rongeurs, de nombreuses autres molécules furent synthétisées. Elles sont regroupées sous le terme d'anticoagulants de seconde génération. Les anticoagulants de seconde génération sont notamment constitués de la bromadiolone, du difénacoum, de la diféthialone, du brodifacoum et du flocoumafène.

II.3.2 Enjeux des anticoagulants

II.3.2.1 Enjeux dans la gestion des populations de rongeurs sauvages

Les rats (*Rattus Norvegicus* et *Rattus rattus*) forment des populations ubiquistes et opportunistes, présentes sur tous les continents, excepté l'antarctique (Lund 1994). Ces populations de rongeurs ont un impact important sur les écosystèmes insulaires en mettant en danger la diversité écologique et l'économie des îles dont elles ne sont pas indigènes [124, 153]. Les rats ont aussi un impact important dans les villes, où ils sont couramment considérés comme une population commensale, créant régulièrement de nombreux dégâts [26, 51]. Une partie des réserves mondiales de nourriture est mangée par les rats, notamment dans les pays en développement [4, 22]. De plus, ils participent à l'entretien et à la transmission d'agent infectieux comme les leptospires [47, 175, 186]. Pour toutes ces raisons, il est nécessaire de contrôler ces populations de rongeurs.

Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, seuls les pièges physiques et les poisons à effet immédiat étaient utilisés. Cependant, ces techniques sont inutilisables à grande échelle, pour des raisons de coût et de dangers pour la population humaine. De plus, elles deviennent rapidement inutiles face aux rats qui associent ces pièges et ces appâts à la mort de leurs congénères [88, 149].

Les anticoagulants anti-vitamines K (AVK) sont largement utilisés depuis 1947 dans la gestion des populations de nuisibles notamment des rongeurs. Ils comportent deux avantages principaux : l'existence d'un antidote efficace et un effet clinique à retardement. Ces deux points confèrent aux AVK une certaine sécurité. De plus, la dose utilisée contre les nuisibles est très faible comparativement à la dose létale pour un homme. En outre, le risque d'hémorragie n'intervient qu'à partir de 48h après la prise [3], ce qui laisse le temps de prendre en charge la personne intoxiquée avec un traitement à base de vitamine K. Cependant, en raison de la forte rémanence des AVK dans le corps, l'antidote devra être administré pendant plusieurs semaines. Ce retard dans les effets cliniques en fait aussi un bon raticide. En effet cela permet d'éviter une association par les rats, entre la prise d'un appât et la mort ou les symptômes de leurs congénères.

II.3.2.2 Enjeux en médecine humaine

Les troubles de la coagulation font partie des affections ayant une forte prévalence chez les patients vieillissants. Avec l'âge, le sang gagne en viscosité ce qui peut augmenter le risque d'accident vasculaire cérébral ischémique ou d'infarctus du myocarde. Les anticoagulants sont des molécules essentielles pour la gestion des troubles de la coagulation. La warfarine a longtemps été l'anticoagulant le plus utilisé, dès son arrivée sur le marché, et ce, jusqu'en 2011 qui a vu une augmentation de la prescription des nouveaux anticoagulants [92, 164]. Malgré l'arrivée des nouveaux anticoagulants, les AVK restent un traitement de choix dans de nombreuses affections induisant un risque de thromboembolie, notamment la fibrillation atriale [164].

La difficulté de l'utilisation des AVK tient à la nécessité d'un suivi précis des paramètres de la coagulation tout au long du traitement et à la difficulté de fixer la dose optimale pour chaque patient. En effet, de nombreux paramètres génétiques influent sur la sensibilité de l'enzyme VKORC1 du patient et sur le métabolisme des AVK. Un sous-dosage entraîne une inefficacité du traitement et un sur dosage peut engendrer des hémorragies importantes parfois mortelles [25]. Il est donc nécessaire de caractériser au mieux les mécanismes d'interaction patient-AVK pour améliorer l'efficacité et l'innocuité des traitements utilisant des AVK.

II.3.3 Les molécules anti-vitamines K

Depuis la découverte des premiers anti-vitamines K extraits de végétaux, de nombreuses autres molécules ont été caractérisées et synthétisées. On peut classer les AVK en trois familles : les dérivés de la 4-hydroxycoumarine, les dérivés de la 4-hydroxy-thiocoumarine et les dérivés de l'indane-1,3-dione.

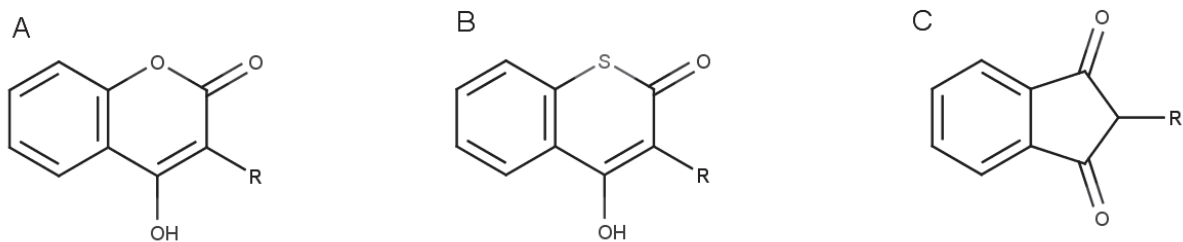


Figure 10 : Bases moléculaires des anticoagulants anti-vitamines K. A : base des dérivés de la 4-hydroxycoumarine ; B : base des dérivés de la 4-hydroxy-thiocoumarine ; C : base des dérivés de l'indane-1,3-dione.

En médecine humaine, seuls les dérivés de la 4-hydroxycoumarine (warfarine) et de l'indane-1,3-dione (fluindione) sont utilisés avec une grande prévalence de la warfarine. Cependant, en ce qui concerne la lutte contre les rongeurs, tous les types de dérivés sont utilisés, mais la warfarine est peu utilisée en raison de sa faible efficacité. La Figure 11 présente certains AVK. Tous les AVK présentent une structure proche de la base naphtoquinone des vitamines K à l'exception des dérivés de l'indane-1,3-dione. La diféthialone, le brodifacoum, le flocoumafène et le difenacoum présentent un important groupement carboné, composé de plusieurs cycles (tetrahydronaphthyl-biphényle), ce groupement caractérise les AVK de seconde génération (à l'exception de la bromadiolone dont le groupement carboné ne comprend que le biphényle). Ce groupement carboné donne aux AVK de seconde génération

des propriétés fortement hydrophobe ce qui augmente leur efficacité par rapport à ceux de première génération.

Par leurs propriétés liposolubles, les AVK sont aisément absorbés par toutes les voies. Leur biodisponibilité par voie orale est proche de 100% et des intoxications par voie cutanée ont été décrites au Vietnam [113].

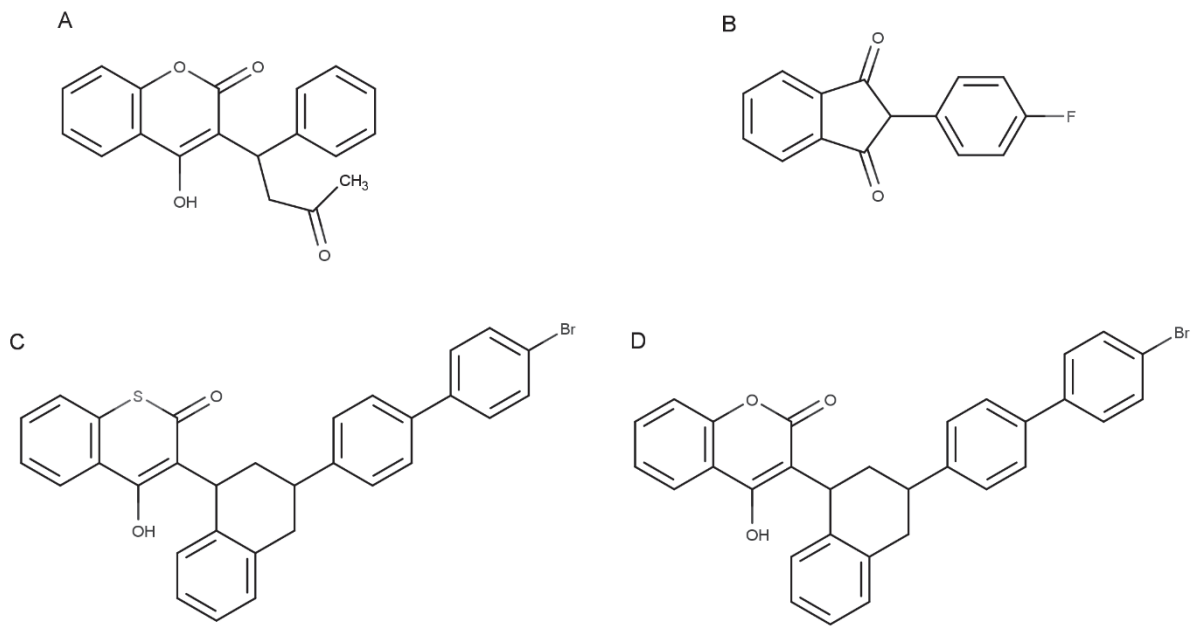


Figure 11 : Exemples de molécules anti-vitamines K. A : Warfarine ; B : Fluindione ; C : Difethialone ; D : Brodifacoum.

II.3.4 Mécanisme d'action

Les AVK sont des inhibiteurs non compétitifs de l'enzyme VKORC1 [98]. Ils peuvent bloquer les deux phases du recyclage de la vitamine K médiées par l'enzyme VKORC1. Le mécanisme moléculaire de l'interaction entre les AVK et VKORC1 n'est pas précisément connu. Une tentative de description a été présentée par Silverman avant d'être contredite par Fasco quelques années plus tard [48, 162, 163]. Plus récemment, Li et son équipe ont proposé, qu'à la vue de la conformation des AVK, qui est proche de celle de la vitamine K, ceux-ci interagissent certainement au niveau du site de fixation de la vitamine K [156]. Une des hypothèses sur l'interaction entre l'AVK et l'enzyme VKORC1 est que l'AVK subirait des transformations semblables à la vitamine K époxyde par la VKORC1, mais qu'une étape serait impossible. L'AVK serait alors lié par une liaison covalente au site actif de VKORC1 rendant ainsi l'enzyme inopérante. Dans cette hypothèse, l'AVK agit comme un substrat suicide, ce qui permet de concilier le fait que la cinétique d'inhibition de VKORC1 par les AVK est non-compétitive, alors que les AVK agissent sur le site actif de l'enzyme.

Suite à l'inhibition du cycle de la régénération de la vitamine K, la concentration en vitamine K hydroquinone diminue. Par conséquent, les facteurs de la coagulation ne peuvent plus être gamma-carboxylés et perdent leur capacité à chélater le calcium et à interagir avec les phospholipides plaquettaires. La cascade de la coagulation est alors rompue.

Pour étudier les propriétés des anticoagulants anti-vitamines K, deux voies sont possibles : l'étude *in vivo* des paramètres de la coagulation ; l'étude *in vitro* des paramètres enzymatiques de VKORC1 et de son inhibition par les AVK.

II.3.5 Élimination

L'élimination des anticoagulants se fait après métabolisation hépatique par les cytochromes P450 (CYP). Le type de cytochrome P450 impliqué varie en fonction de la molécule [3]. Ainsi, le type CYP2C9 est un acteur essentiel de la dégradation de la S-warfarine qui est la forme la plus rémanente de la warfarine [3, 64]. La R-warfarine est éliminée par le CYP1A2 et le CYP3A4 de façon beaucoup plus rapide que ne l'est la S-warfarine par le CYP2C9. Ainsi, les mutations du CYP1A2 ou CYP3A4 influencent peu la pharmacocinétique globale de la warfarine. À l'inverse, le polymorphisme du gène codant pour le CYP2C9 influence, de façon

importante, la pharmacocinétique de celle-ci. Il est primordial de prendre en compte ce polymorphisme, dans le calcul des doses thérapeutiques de warfarine dans l'espèce humaine, afin d'éviter des complications [5, 104].

De façon générale, la dégradation métabolique des AVK est lente. Ainsi la demi-vie hépatique des AVK est longue : presque 2 jours pour la warfarine chez l'homme [76]. Quant aux AVK de seconde génération, ils sont très peu métabolisés et présentent des demi-vies hépatiques allant jusqu'à une centaine de jours [45]. Certains médicaments, tel le fluconazole, peuvent augmenter la demi-vie des AVK en inhibant les cytochromes P450 [18].

La cinétique d'élimination est biphasique avec une première phase rapide de quelques heures et une seconde de plusieurs semaines [58]. L'élimination après métabolisation est principalement fécale.

II.3.6 Article 1 : La résistance aux anti-vitamines K et son étude

Cette partie de la bibliographie est composée d'un chapitre du livre « Anticoagulant therapy » portant sur la comparaison des différents mécanismes de résistance aux anticoagulants anti-vitamines K entre l'Homme et les rongeurs. Après une brève présentation du cycle de la vitamine K, de son importance, et de la topologie de la VKORC1, le chapitre présente les différentes méthodes de mise en évidence et d'étude des résistances aux anticoagulants anti-vitamines K de l'Homme et des rongeurs. Enfin, l'ensemble des résistances recensées chez l'Homme sont présentées et comparées avec celles présentes chez les rongeurs.

Comparative Biology of the Resistance to Vitamin K Antagonists: An Overview of the Resistance Mechanisms

Sébastien Lefebvre, Etienne Benoit and
Virginie Lattard

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/64204>

Abstract

Vitamin K antagonists (VKA) are used in human medicine as well as for the management of rodent populations. In both cases, we have to deal with inter-individual resistances. Many mechanisms of resistances are common in humans and rodents. Moreover, with the large use of vitamin K antagonist rodenticides, the resistant phenotype is overrepresented in some rodent populations. Consequently, some resistance mechanisms with a low prevalence in the human population have a higher prevalence in rodent population; thus, they can be more studied in rodents. The aim of this chapter is to cross knowledge coming from human medicine and rodent research in order to better understand each resistance mechanism. After an overview of the essential knowledge for the understanding of the VKA action, this chapter presents the different methods of VKA resistance studying and then it assesses the current knowledge on VKA resistance in humans and rodents.

Keywords: vitamin K antagonists, warfarin, comparative biology, pharmacogenomics

1. Introduction

Vitamin K antagonists (VKA) are inhibitors of the regeneration cycle of vitamin K. The diminution of the available and usable vitamin K in the body induced by VKA leads indirectly to a hypocoagulable status of the blood. The use of VKA in humans and rodents pursues this status. Nevertheless, the final aim is different for each. In the human case, VKA anticoagu-

lants are used to prevent venous and arterial thrombotic event. In spite of the increasing use of new oral anticoagulants, VKA and, more precisely, warfarin are the most commonly prescribed anticoagulants [1]. Considering rodents, VKA are used in pest population management. In this case, death resulting from hemorrhages is pursued. VKA are currently the most used and one of the best rodenticides for two reasons. First, the delay between VKA administration and death is of several days, which avoids association between bait and death by the other rodents. Second, conversely to other rodenticides, VKA have an antidote: the vitamin K, which increases their safety for the human population and nontarget species.

In humans, VKA anticoagulants have a narrow therapeutic range [2]. Under- and overdoses can have serious consequences by the lack of efficacy or adverse event. Warfarin has been ranked number 9 among primary suspect drugs having serious outcomes in the United States during the beginning of the 2000's decade [3]. Indeed, the VKA dose has to be modulated, reflecting the genotype of patients more than other common drugs. Thus, it is necessary to identify and characterize each gene and mutation which may influence the VKA dose. In this task, the VKA research on pest management can be helpful. Indeed, management of rodent population has to deal with VKA resistances as well as in human medicine. Many mechanisms of resistances are common in humans and rodents. Moreover, with the large use of vitamin K antagonist rodenticides, the resistant phenotype is over-represented in some rodent populations. Consequently, some resistance mechanisms with a low prevalence in the human population have a higher prevalence in rodent population; thus, they can be more studied in rodents.

After a rapid presentation of the basis of vitamin K and VKA mechanisms, this chapter presents the different methods to assess VKA resistance mechanisms. Then, an assessment of the VKA-resistant pathways described in humans and in different rodent species is performed.

2. Basis of vitamin K metabolism

2.1. Vitamin K

The name "vitamin K" gathers a great number of molecules. All vitamin K are based on a naphthoquinone core and are sorted in three classes, numbered from 1 to 3. The substitution on the carbon 3 of the core determines the class of the vitamin K. Vitamin K1 is composed of only one molecule, the phyloquinone, where the carbon 3 is substituted by a phytyl moiety. It was the first vitamin K described in 1935 by Dam [4], and chemically identified and synthesized by Doisy [5]. Vitamin K2 regroups the menaquinones. The substitute is a chain of prenyl, and the number of prenyls is indicated in the name. For example, the menaquinone 4 side chain is composed of 4 prenyl. Finally, vitamin K3 or menadione is only constituted by the naphthoquinone core (**Figure 1**).

Phylloquinone is synthesized by plants [6]. Menaquinones are synthesized from phylloquinone. The number of prenyls of the synthesized menaquinone depends on the bacteria, fungi, and animals which synthesize them. Mammals are only able to synthesize menaquinone 4 with

the help of the *UBIAD1* gene [7, 8]. Consequently, other menaquinone forms come mainly from fermented alimentation or gut microbial synthesis [9, 10].

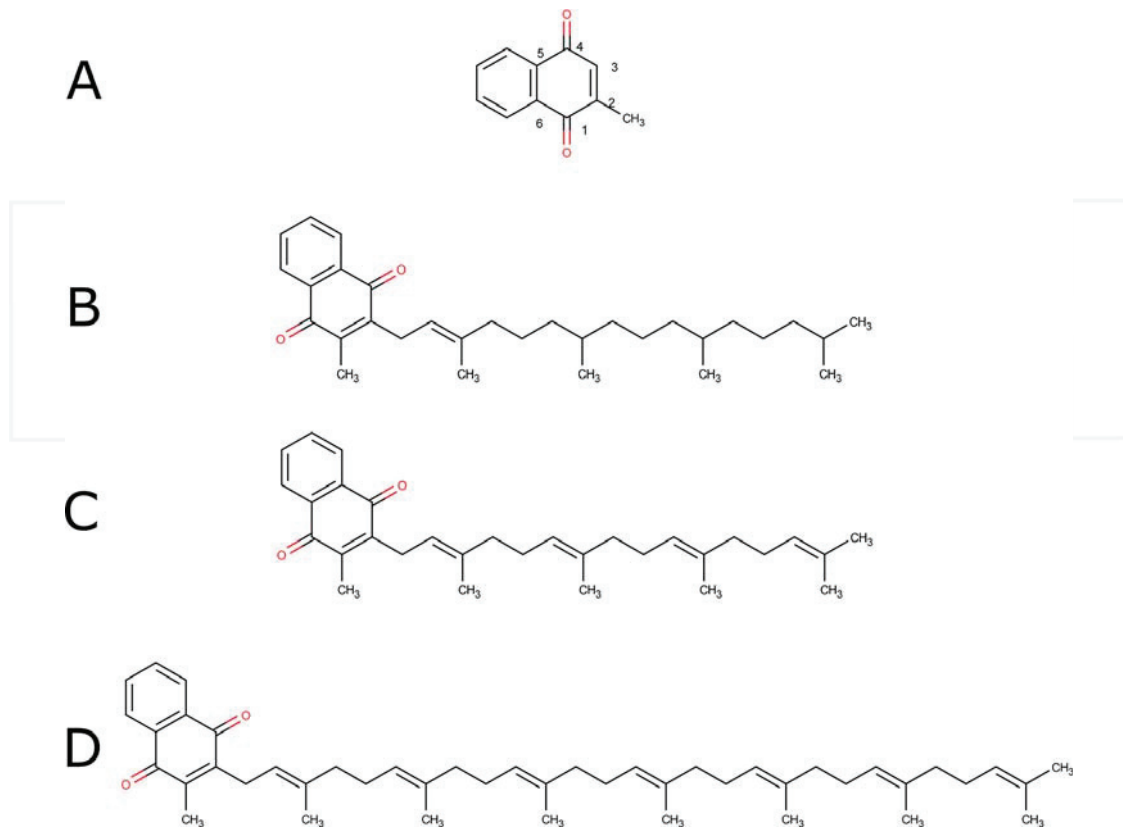


Figure 1. Examples of vitamin K: (A) menadione; (B) phylloquinone; (C) menaquinone 4; (D) menaquinone 7.

As many other fat-soluble vitamins, vitamin K's absorption increases with fatty intake [11]. The absorption of vitamin K occurs in the gut, nevertheless its mechanism has been unclear during many years [12]. Recently, a study suggested that the cholesterol transporter, the Niemann-Pick C1-like 1 protein, would be responsible for the vitamin K's absorption [13].

2.2. Vitamin K roles

The name of the vitamin K comes from the German word "koagulation." Indeed, when vitamin K was discovered, its deficiency involved bleeding [4]. Nevertheless, it is only in the 1970s that we began to understand the vitamin K's mechanism of action. Vitamin K is a cofactor of a post-transcriptional gamma-carboxylation which activates vitamin-K dependent proteins (VKDP) [14]. Four clotting factors of the coagulation cascade are the VKDPs, factors II, VII, IX, and X, which explain the bleeding issues observed in case of deficiency. Proteins C, S, and Z are also VKDPs involved in coagulation, but they have an antithrombotic effect. Nevertheless, the main effect of VKA is anticoagulation, even though the rapid decrease of these antithrombotic molecules can lead to a transient hypercoagulable state at the beginning or at the end of treatment with possible adverse events [15, 16].

The second great role of vitamin K is bone regulation with two VKDPs: osteocalcin and matrix GLA protein [17, 18]. This last protein is also involved in the protection against tissue calcification [19]. Vitamin K is involved in many other biological functions which are reviewed in Refs. [20, 21].

2.3. Vitamin K regeneration cycle

2.3.1. Vitamin K cycle

In spite of the low vitamin K level in food, vitamin K deficiency is rare [22]. Indeed, vitamin K is recycled by cells. The cycle is composed of two great steps: the use of vitamin K hydroquinone by the GGCX enzyme to activate VKDPs and the regeneration of the vitamin K hydroquinone from the epoxide form by VKORC1 (Figure 2).

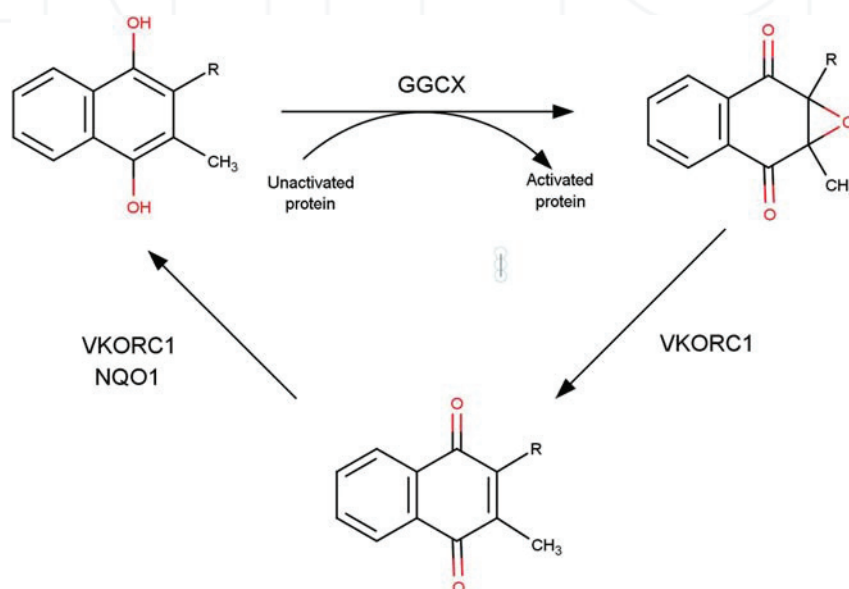


Figure 2. Vitamin K regeneration cycle.

In order to chelate calcium and to be active, the glutamate residues (Glu) of VKDPs have to be carboxylated to carboxyglutamic acid (Gla). This reaction is mediated by gamma-glutamyl carboxylase (GGCX). GGCX recognizes the VKDPs with the the help of their propeptide [23, 24]. Then, GGCX removes the gamma-hydrogen of Glu residues and adds CO_2 ; the oxidation of vitamin K hydroquinone (KH_2) to vitamin K epoxide ($\text{K} > 0$) provides the required energy [25]. This reaction is performed in the endoplasmic reticulum [26].

2.3.2. VKORC1 structure

The *VKORC1* gene was located in 1969 on the chromosome 1 of rat by discovering a link between the coat color heritage and the resistance to warfarin [27]. Then it was located on the chromosome 7 of mice in 1976 [28] and on the human chromosome 16 in 2002 [29]. The first

characterization of the *VKORC1* activity was performed in 1974; nevertheless, at this time the responsible protein of this activity was unknown [30]. The identification of the *VKORC1* coding gene has only been performed in 2004 by two teams: one used short interference RNA functional screening [31] and the other used interspecies genetic linkage analysis [32]. Once identified and sequenced, the *VKORC1*'s structure and function study begun.

A complete review of the current knowledge on the *VKORC1* structure has been recently done [33]. *VKORC1* is a membrane protein of the endoplasmic reticulum. The activity of *VKORC1* seems to be due to CXXC patterns. *VKORC1* presents two CXXC patterns, with cysteines positioned at Cys43, Cys51, Cys132, and Cys135 in human *VKORC1*. These cysteines are widely conserved through species, which might indicate that they have a key role in *VKOR* activity [34]. Cys132 and Cys135 are located in a transmembrane domain. They seem to be essential for the *VKORC1* activity and might lead the nucleophilic attack supposed by a biochemical model of the *VKOR* reaction [34, 35]. Mutation of one of them to serine abolishes the enzymatic *VKOR* activity [36]. To reduce vitamin K, *VKORC1* needs to be itself reduced by a physiological partner. This partner and its mechanism of action are currently unknown. Schulman et al. proposed that the partner might reduce the loop cysteines (Cys43 and Cys51). Then the loop cysteines would transfer the reducing power to Cys132 and Cys135 of the active site [37]. However, other studies have reported that the mutation of one of these cysteines to serine has no consequence on the *VKORC1* activity [38–40]. Moreover, the conformation of *VKORC1* is still under debate between a topology with three transmembrane domains or four [41]. This last point is determining for the comprehension of the possible role of the loop cysteines. Indeed, they are either in the cytosol for the three transmembrane model or in the endoplasmic reticulum's lumen for the other model.

VKORC1 presents a strong homology between rodents and humans, allowing to compare the mutation between them. Mammals and bacterial *VKORs* are homologs, but their conformation and reaction seem different [42].

Mammals have another enzyme able to reduce the vitamin K epoxide, the *VKORC1L1*. It is mainly expressed in the extrahepatic tissues [43–45] and has a great similarity with *VKORC1* [46]. Its inhibition by VKA is lower than its homolog [43]. Nevertheless, due to its low hepatic expression, its influence on the anticoagulant resistance is negligible. However, it might explain that the other vitamin K functions are not significantly impacted by VKA treatments.

2.4. Vitamin K antagonists

First VKA has been discovered in 1941 and then isolated in spoiled sweet clover by Hueber and Link [47]. Sweet clover (*Melilotus officinalis*) contains coumarin. In a poorly preserved silage or hay, this coumarin can be changed to dicoumarol by *Penicillium* species commonly present in soil [48, 49]. The dicoumarol contained in spoiled forage causes a hemorrhagic condition called sweet clover disease. Some years after this discovery, Coumadin, a synthetic VKA also called warfarin, was synthesized [50]. This last molecule is still the most commonly prescribed anticoagulant. Concerning rodents, many new VKA have been developed to reply to resistance emergence.

Three VKA families are used: the 4-hydroxycoumarin derivatives, the 4-hydroxy-thiocoumarin derivatives, and the indane-1,3-dione derivatives (**Figure 3**). All derivatives are used against rodents. Conversely, in human medicine, only the 4-hydroxycoumarin derivatives (for instance, warfarin) and the indane-1,3-dione derivatives (for instance, fluindione) are used. Moreover, in order to deal with rodent resistances, second generation of 4-hydroxycoumarin derivatives and of 4-hydroxy-thiocoumarin derivatives have been designed with complex radicals (**Figure 3C and D**).

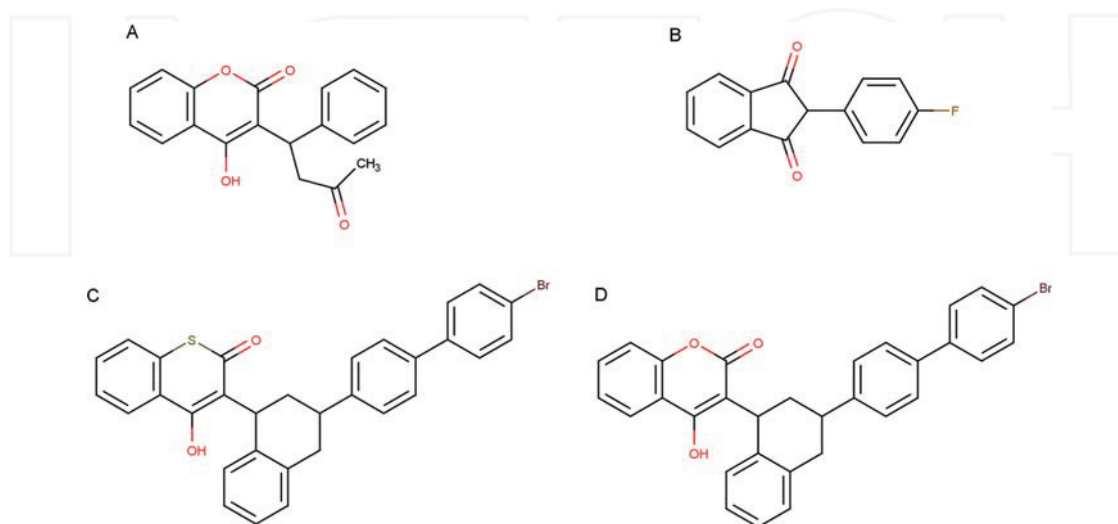


Figure 3. Examples of some VKA: (A) warfarin; (B) fluindione; (C) difethialone; (D) brodifacoum.

2.4.1. Mechanism of VKA action

Vitamin K antagonists stop the vitamin K recycling by performing noncompetitive inhibition of the VKORC1 enzyme [51, 52]. Nevertheless, the binding of VKA with VKORC1 enzyme is still a gray area. The reversibility of the binding is presently unknown [52–54], as well as the binding site. First, the binding site has been located at the level of the TYA motif (residues 138–140 in human VKORC1) close to the CXXC active site. Indeed, the mutation of the 139 tyrosine of this motif is associated with warfarin resistance in humans and rodents [55, 56], and by analogy the dicoumarol's binding site on NQO1 is also a TYA motif [57]. However, these mutations are moderately susceptible to second generation VKAs in rats [55, 58], which can suggest that other amino acids might be involved in this binding. Recently, Czogalla et al. have proposed a model involving three binding interfaces between warfarin and human VKORC1 [59].

2.4.2. VKA elimination pathway

The VKA treatments are established on the long term. Consequently, their elimination is a key factor which determines their liver concentration and finally their efficiency. The elimination pathway seems to depend on the molecule and on its enantiomeric form. Indeed, enantiomers of warfarin are eliminated differently. The (S)-enantiomer is metabolized exclusively by the

hepatic cytochrome P450 isoform 2C9 (CYP2C9), while (R)-enantiomer is metabolized by isoforms CYP1A2, CYP2C19, CYP3A, and hepatic ketoreductase [60, 61]. Although the (R)-enantiomer has a longer half-life, it is less efficient, and the modulation of its elimination has no significant impact on the coagulation [62–64]. However, the activity of CYP2C9 is critical in the determination of the warfarin dose. Indeed, CYP2C9 activity is influenced by many drug interactions [65–68], and polymorphism of CYP2C9 can also modulate the sensitivity to warfarin.

3. Assess the resistances

Since the discovery of rats that are resistant to warfarin in 1960 by Boyle [69], the assessment and the study of resistance mechanisms have become a key issue for the rodent population management and in human medicine. Many methods have been developed to study these resistance mechanisms. Their purpose is to isolate the possible origins of the resistance in a standardized model and to evaluate if the induced resistance factor is of the same order as that one observed *in vivo*. The resistance factor is the factor by which the dose or concentration of VKA required for a susceptible population must be multiplied to achieve the same effect within a resistant population. We present below the main methods, and for each we pinpoint its advantages and limits.

3.1. *In vivo* animal studies

In vivo studies were commonly used in rodent VKA research in order to evaluate the efficiency of an anticoagulant or the consequences of *VKORC1* mutations. The first resistance case in rodents was assessed by Boyle. He fed suspected resistant with containing VKA food and control rats during 5 days. Then, the death rate between the two groups was compared [69]. This kind of survival challenge is efficient to qualify a resistance state and remains the gold standard to test commercial rodenticides. Nevertheless, these tests are long and have many shortcomings concerning animal welfare and the repeatability. Moreover, it is difficult with this test to compare two VKAs and to assess the dose–response law.

Later, new methods based on blood clotting test have been developed [70–72]. They were standardized by the Rodenticide Resistance Action Committee in order to obtain a discriminating dose for each VKA [73]. These doses of anticoagulants, called effective doses 50 (ED50), were determined to quantify the susceptibility of rats to anticoagulants. ED50 is the dose leading to 50% of animals tested with a fivefold increase of the international normalized ratio 24 h after the administration of anticoagulants. This technique is more precise and rapid. Nevertheless, this method gives few information on the mechanism of resistance.

The origins of resistances in wild strain can be multifactorial. For example, they can involve *VKORC1*-linked resistance and cytochrome-linked resistance. It is possible to refine *in vivo* methods by introgressing the studied wild mutation in laboratory strain. With this method, it is possible to isolate the resistant mutation in a susceptible genetic background [55].

If the animal *in vivo* studies are still the gold standard to the understanding of the complex effect of VKAs and of resistant mutations, they are expensive and laborious in the preparation and care of the strain and in the realization of experiments. Moreover, it may be interesting to study more precisely each mechanism by *in vitro* methods [74].

3.2. *In vitro* enzymatic study

The VKOR activity can be reproduced *in vitro*. These methods are based on the kinetics of vitamin K quinone production by an enzyme system from vitamin K > O. To perform this reaction, the substrate (vitamin K > O) is beforehand synthesized according to the method described by Tishler et al. [75]. The evaluated enzyme can come from animal tissues or heterologous expression culture (cell, bacteria, yeast, etc.). Finally, dithiothreitol (DTT) is commonly used to transfer the reduction power to the enzyme. The studied VKOR-specific activity and the Michaelis constant are calculated [76]. It is also possible to add VKA to study its inhibition efficiency. In this case, an inhibition constant can be obtained for each couple of enzymatic system and VKA. Methods to perform these experiments are described in Refs. [43, 58, 76].

This simple experiment pattern allows us to assess the efficiency of large origins of enzymatic system. As the VKOR proteins are located in the membrane of the endoplasmic reticulum, they are present in the microsomal fraction of tissues. The commonly used microsomal preparation methods are described in Ref. [76]. Microsomes are prepared from other cell components by differential centrifugation. Microsomal enzymatic activity evaluates the enzymatic efficiency of whole microsomal VKOR activity and not only of the VKORC1 enzyme activity. Indeed, Hammed et al. have pinpointed that a modeling with two enzymes (VKORC1L1 and VKORC1) is necessary to explain the inhibition of the testis microsomal activity by warfarin [43]. Moreover, as for *in vivo* experiment, the strains with interesting mutations have to be selected and preserved.

To isolate the activity of one enzyme or to perform enzymatic activity with human-like enzyme or mutated enzyme, it is possible to perform a heterologous expression in yeast (*Pichia pastoris*) of VKOR enzymes and then extract the yeast's microsomes. The method is described in Ref. [58]. Yeast has neither endogenous VKORC1 nor VKORC1L1. Thus, this method allows the study of the influence of VKORC1 and/or VKORC1L1 mutation on their respective specific activities and VKA resistance without interaction. The yeast model has been validated for some mutations as Y139F for which the resistance rate of rat's liver microsomes is the same as that of yeast microsomes. Moreover, it is also possible to test some hypothetic mutations. The yeast expression method is more focused on the enzyme activity than tissue microsomes and opens many experimental opportunities. However, the studied activity is still the microsome activity. With the previous methods, enzymes are in their microsomal environment. In order to study more precisely VKORC1-linked resistances, it would be interesting to purify VKORC1.

The purification of VKORC1 was for many years a big business [77, 78]. Indeed, this enzyme loses its activity during the solubilization. It was only in 2006 than Chu et al. have purified the recombinant human VKORC1 produced from a baculovirus in insect cells which was still active after purification [79]. In this experiment, microsomes were washed from non-VKORC1

proteins. The artificial membrane inclusion of VKORC1 after heterologous expression in *Escherichia coli*, its extraction, and its purification have recently been described [80]. Briefly, the *hVKORC1* gene has been expressed in *E. coli* BL21(DE3) in a KSI-hVKORC1-His₆ construct [81]. The ketosteroid isomerase (KSI) part promotes the expression of the protein in insoluble inclusion bodies. KSI part was linked with hVKORC1 by a formic acid cleavage site. Finally, the construct was hexahistidine-tagged. After the expression, proteins were preserved under denaturing conditions and purified with a HisTrap Ni-NTA column. Then the KSI part is removed with formic acid. The refolding of hVKORC1 was performed with pulsed renaturation and “artificial chaperone.” Then the proteins were incorporated in a lipid layer to form a liposome. Jaeneke reported that the obtained hVKORC1 liposome had only 10% of the specific activity of the enzyme obtained with HEK293 cell [80]. These new purification methods are not currently used in the resistance study and need improvement. Nevertheless, they open the way for a better understanding of the VKORC1 topology and the influence of mutations on VKOR activity.

The enzymology studies are the basis of our current understanding of VKORC1 mutations and interaction with VKA. It is currently the technique with the best reproducibility and more reliability. Nevertheless, some issues are still pending with these methods. The major issue comes from the DTT which gives the reducing power to VKORC1 in experiments. DTT is a powerful reductor which might bypass some dysfunctional mechanisms of mutated enzyme by directly activating the active site [37]. Moreover, high concentration of DTT (>1 mM) add a background level. To limit it, Krettler et al. proposed the use of tris(3-hydroxypropyl)phosphine instead of DTT [82]. Nevertheless, there is not enough knowledge currently on this new methods and its VKORC1 interaction to change the method. Moreover, tris(3-hydroxypropyl)phosphine is less efficient in VKORC1 enzyme reduction than DTT at usual concentration.

Another issue might be that these methods study only the impact of VKA and resistant VKORC1 enzyme on the vitamin K regeneration cycle and not on the vitamin K-dependent protein gamma carboxylation. The required lipid environment and detergents are different for the activity between GGCX and VKORC1. Thus, it is currently difficult to study the interaction between both enzymes in an *in vitro* enzymatic assay [83]. These discrepancies imply that enzymology results have to be analyzed in view of the *in vivo* results.

3.3. *In vitro* cell study

In order to evaluate the complete reaction from vitamin K reduction to gamma-carboxylation and to solve some enzymatic study issues, the functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells has been recently developed by Tie et al. [83], which was then adapted by other teams [84, 85]. In these studies, the production of a complete carboxylated protein by cell culture was assessed. The cells were HEK 293 cells transfected with the studied *VKORC1* gene and a VKDP. Then, cells were cultured in an environment containing vitamin K epoxide and the studied VKA. All methods have followed the gamma-carboxylation of factor IX gla domain by its monoclonal antibodies recognition [86] or by measuring its activity (only for complete factor IX). Three different vitamin K-dependent proteins have been used: the simple factor IX protein (FIX) [59, 84, 87]; the chimeric protein FactIXGLA, which was protein C with its gla

domain replaced by the factor IX gla domain [40, 83]; the chimeric protein FIXgla-PRGP2, as previously the gla domain of the proline-rich gla protein was replaced by FIXgla domain [85]. Concerning the method using FIX [84, 87], the gamma-carboxylation was assessed by measuring the clotting activity of the concentrated culture medium mixed with factor IX-depleted plasma. For the FIXgla-PC method [40, 83], quantification is performed on the culture medium by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with anti-FIXgla domain antibodies as coating antibodies. Although Jamil also used a chimeric protein transformed with a FIXgla domain for its quantification, in this case, it was the membrane protein, the proline-rich Gla protein 2, which was used. With this modification, carboxylated protein gla domains were presented at the surface of the cell, then recognized by monoclonal antibody conjugated to allophycocyanin and quantified by flow cytometer [85].

This new method is not standardized yet, and there is still a gray area in the interpretation of the obtained results. Indeed, some discrepancies exist between enzymatic assay and cell assay results [84, 88] and even between cell assay results [40, 59]. The origin of these discrepancies might be the interference of the cell's endogenous enzymes, in particular VKORC1L1, which is naturally more resistant than the wild VKORC1 enzyme [43]. In this way, standard cell assays have showed that all tested mutations were resistant [59, 84]. Tie et al. have dealt with this by knocking out endogenous *VKORC1* and *VKORC1L1* genes, using the transcription activator-like effector nuclease technology [40]. Thus, Tie et al. have confirmed the interaction of the endogenous enzyme in the cell assay, and they have showed that some mutations previously classed as resistant by Czogalla et al. [59] are in fact not resistant [40].

The second issue for the interpretation of cell assay is the lack of knowledge and control on it. This kind of assay is more complex than simple enzymatic activity; it involves many mechanisms that are currently uncontrolled or unknown: the level of the recombinant VKORC1 enzymes and the recombinant VKDP; the quantity and the efficiency of the physiological partner of VKOR enzymes, which are still unknown; the level of the endogenous GGCX protein; finally, the possible other mechanisms currently undescribed. All these elements determine if the studied enzymes are not bypassed and if the vitamin K reduction is the limiting reaction. These two conditions have to be fulfilled to validate completely the cell assay. However, some studies have pinpointed that the limiting reaction might be the VKORC1 enzyme reduction by its physiological partner and not the vitamin K reduction [89–91].

Although cell assays are recent and still have a gray area in the interpretation of their results, there is no doubt that they will become a key element of the study of VKA resistance mechanisms.

3.4. Pharmacogenomics study

The pharmacogenomics studies are the main source of *in vivo* information on the VKA resistance in humans. These studies assess the correlation between some genetic parameters and the warfarin dose, which allows to keep the patient's INR in the target zone. Among these parameters, the VKORC1 and the CYP2C9 polymorphisms are keys. But many other parameters, which might influence the VKA susceptibility, are unknown and cannot be evaluated by these studies. Pharmacogenomics studies assess the epidemiology of the mutations linked

to resistance and can help in the determination of the treatment's starting dose by taking in account of patient's genome. But, their contribution to the study of the resistance pathway is limited to the confirmation or not of the results obtained with other methods.

4. Resistance pathways

4.1. VKOR-linked resistances

4.1.1. VKORC1 human genotypes

The pharmacogenomic studies and the reports of warfarin treatment failures have pinpointed two kinds of polymorphisms linked to VKORC1 which influence the warfarin dose requirements. The first is linked to the polymorphism in the noncoding region and the second is linked to missense mutations.

The polymorphism in the noncoding region is the origin of the majority of VKA dose variations [92–95]. Indeed, the noncoding region influences the transcription level of VKORC1 [94]. Nevertheless, these variations are minor, few milligrams of increase or decrease. So, it is not really resistance to VKA, but rather a slight modulation of VKA sensibility.

Conversely, the VKORC1 coding mutations are rare, and some involve a real resistance to VKA. They are characterized by a dose to stabilize the anticoagulation, which is higher than the high-dose threshold defined by Watzka: phenprocoumon 3.0 mg/day, acenocoumarol 3.5 mg/day, warfarin (W) 7.1 mg/day, and fluindione 19.8 mg/day, for mean age patients [56]. Please note that the definition of warfarin resistance is not well-defined. Currently, there are more than 27 mutations that have been described in patients with high requirements of VKA dose. They are summarized in **Table 1**.

Mutation	Number of patients	Molecule	Dose (mg /day)	Stable anticoagulation	Ref.	Confirmation of resistance by <i>in vitro</i> method [†]
A26P	1	W	20	No	[106]	Yes [88]
		F	100	No		
A26T	1	W	6	No	[56]	No [88]
L27V	1	W	7	Yes	[107]	No [88]
		F	60	No		
H28Q	1	P	10	yes	[56]	No [88]
V29L	2	W	14	?	[32, 56]	
		P	26	Yes		
A34P	1	W	27	Yes	[108]	
D36Y	31	W	16.1 [3–36]*	~	[56, 96, 105, 106, 109]	No [88]
		F	45	No		

Mutation	Number of patients	Molecule	Dose (mg /day)	Stable anticoagulation	Ref.	Confirmation of resistance by <i>in vitro</i> method [†]
		A	7	No	-112]	
		P	7 [6.9–7.1]	Yes		
D36G	1	W	20	Yes	[56]	No [88]
A41S	1	W	16	?	[94]	No [88]
V45A	1	W	45	No	[32]	No [88]
S52L	1	P	9	No	[113]	Yes [40]
S52W	1	P	10	Yes	[56]	No [40]
V54L	2	W	21 [10–32]	~	[105, 106]	Yes [88]
		F	60	No		
		A	8	No		
S56F	1	P	15	No	[56]	No [88]
R58G	1	W	34	?	[32]	No [88]
W59R	3	A	9.3 [8–12]	No	[113, 114]	Yes [40]
		P	9	No		
W59C	1	P	11	No	[56]	No [88]
W59L	1	P	15	No	[56]	Yes [40]
V66M	15	W	31.5 [20–42]**	Yes	[56, 103, 105,	No [40]
		P	9.5 [9–10]	~	106, 108]	
V66G	1	P	8	Yes	[56]	No [40]
H68Y	1	–	–	–	[115]	Yes [88]
G71A	1	P	6	No	[56]	No [40]
N77S	1	P	9	No	[56]	Yes [40]
N77Y	1	W	25	Yes	[56]	No [40]
I123N	1	P	21	No	[56]	Yes [88]
L128R	16	W	44	No	[32, 105,	Yes [40]
		F	80	No	106, 116]	
		A	13	No		
		P	30	No		
Y139H	1	P	9	No	[56]	Yes [88]

Adapted and completed with permission from Ref. [88].

* A case report, which includes a 2-year-old girl, is not included [117].

** A report of two cases was not used due to its imprecision on the doses [118].

† Results of the Oldenburg's team are not reported [59, 84].

? no data are present on the stabilization of the anticoagulation in study.

~ only some patients have a stabilization of their anticoagulation.

Table 1. Genetic variations in the coding sequence of human VKORC1 in patients requiring high dose of a vitamin K antagonist.

Conversely, another mutation has been described by Rost in two Libyan families, the R98W mutation. Homozygous patients with this mutation have a combined deficiency of vitamin-K-dependent clotting factor type 2 which causes bleeding [32]. This deficiency can be treated by a daily dose of vitamin K. Rost et al. have shown in enzymatic assays that R98W-mutated VKORC1, which was expressed in HEK cell, has a VKOR activity diminished of 90% [32].

Some mutations have a higher prevalence in some populations. Thus, the D36Y mutation is relatively well represented in some African populations [96]. The Ethiopian population and the Ashkenazi Jews population have a D36Y allele frequency of respectively 15% and 4% [97–99], while this mutation is absent in South African or in Chinese populations [100, 101]. Concerning the V66M mutation, it has been described in African and African-descent populations [102–104]. Finally, the L128R mutation has been described in different families [32, 105].

Nevertheless, the other reported mutations have been described only one time and sometimes on patient with unstabilized anticoagulation. These elements reduce the possibilities to determine a resistance factor for each. Moreover, the mutations have been often described as fortuitous events of pharmacogenomics studies [94]. Finally, the interactions with other mutations on cytochromes, GGCX, or noncoding part of VKORC1 genes can also modulate the warfarin dose and enhance or reduce the resistance. Thus, the assessment of these mutations only from case report entails a lot of bias.

In order to deal with the described bias, the *in vitro* results can be useful. The *in vitro* results from enzymology [88] and cell assays [40] have been reported in **Table 1**. Nevertheless, all mutations do not seem to be associated with resistance in *in vitro* assays. Only Oldenburg have found that all the VKORC1 coding mutations were resistant with a cell method assay; his results are not reported in the table [59, 84]. This discrepancy between assays might be due to the VKORC1L1 gene as afore-explained in the description of the cell assays. Moreover, enzymology assay pinpoints that some mutations drastically diminish the VKOR activity of the enzyme [88], whereas cell assays do not [40]. The study of the paralog mutations in rodents may help to understand the real impact of these mutations on the resistance.

4.1.2. VKORC1 rodent genotypes

Resistances have evolved differently in rodents according to their species. Indeed, the anticoagulant pressure is exerted differently on each. These differences depend on the behavior of the rodents, and more particularly the feeding behavior. Thus, some rodents feed preferentially on one food source (rat), while others feed on many sources (house mice). Thus, rats eat a lot of poisoned grains, whereas mice eat few poisoned baits and dilute them with other food sources.

Resistances have been largely described in house mice (*Mus musculus*) and in Norway rat (*Rattus norvegicus*). VKORC1-linked resistances are due to missense mutations. They have been detected whereupon rodenticide treatment fails. Due to the purpose of the VKA rodenticides, their doses used for management of rodents are important. Consequently, only huge resistances have been pinpointed and then isolated by introgressing the concerned genes in

laboratory strains. Thus, the noncoding mutations, which are involved in the modulation of VKA dose in humans, have not been described in rodents.

Concerning the Norway rat, it has been the first target of the VKA rodenticides and the first to develop resistances [69]. The first description occurred in Scotland, and rapidly the resistance spread all over Great Britain [119, 120]. Denmark has been the second country with warfarin-resistant rats [121]. Entrapments have pinpointed that 24.2% of Denmark's rats were resistant in the 1960s [122]. Since then, resistances have been brought to light from all around the world [123, 124].

Currently, 25 mutations have been described in Norway rats [125]. Nevertheless, only few mutations are widely present and linked with important resistances. The five main mutations in Europe are L120Q, L128Q, Y139C, Y139F, and Y139S [126]. These mutations have different frequencies depending on the geographical areas. Thus, Y139C is the main mutation in Germany and Denmark [126, 127], and Y139F in France [128]. Concerning Great Britain, important discrepancies on the frequencies of mutations have been pinpointed between counties [126, 129, 130]. The frequencies of rat mutations are disproportionate comparatively to human coding mutation frequency. Thus, Y139F mutation is detected in 21% of the French rats [128], but less than 1% of the world human population carries one coding mutation. Moreover, in some areas, the prevalence of the resistant rats is of 100% [131].

Concerning the house mice, their mutations have been described in 1961 in many countries [132]. Currently, more than 10 *VKORC1* mutations have been described [133]. Moreover, 80% of the trapped mice carried at least one *VKORC1* mutation in a study in Germany, Switzerland, and Azores [133]. Finally, some population of house mice have multiple mutations, Arg12Trp/Ala26Ser/Ala48Thr/Arg61Leu, which involve VKA resistance [133]. This mutation may come from an interspecific hybridization with *Mus spretus*. But, only little information is available on *Mus spretus*'s resistance to VKA [133].

4.1.3. Overall approach of human and rodent mutations

The presence of *VKORC1* mutations in humans with very low frequency (<1%) and the fast emergence of resistance in rodents indicate that the mutations were present in rodents well before the use of VKA as rodenticide. The large use of these molecules has selected the resistant mutations of *VKORC1* and increased their prevalence in rodent populations. Moreover, the use of excessive dose of VKA has selected the mutations leading to the most severe resistance, especially in *Rattus norvegicus* populations. Indeed, in Europe, while more than 20 mutations were published, only three mutations seem now widely spread. As the roof rat population is less exposed to VKA than brown rats, the prevalence of their *VKORC1* mutations might be close to human prevalence. The roof rat resistance linked to *VKORC1* mutation has not been widely explored. Recently, Goulois has characterized the Y25F mutation in roof rats [134].

Five amino acid positions of the *VKORC1* enzyme carry a described mutation in both humans and rodents. They are the positions A26, R58, W59, L128, and Y139. Nevertheless, only the mutations A26T, R58G, and W59R are identical. These three mutations are not common in humans, and the reported cases did not have a stable anticoagulation. The A26T mutation does

not seem to enhance the resistance in the rat [125]. These results were obtained with rat *VKORC1* cell expression, and they agree with the results obtained with human *VKORC1* [88]. Moreover, the frequency of this mutation is low in rats which might suggest that the resistance linked to this mutation is insufficient to be selected by the VKA rodenticide pressure. Concerning the W59R mutation, it diminishes considerably the VKOR activity of the enzyme in rats conversely to in humans [40, 125]. Finally, R58G mutation is described both in humans and mice. This mutation does not seem to involve resistance in mice, and as the W59R mutation in rat, it diminishes the VKOR activity [125]. Thus, the results obtained with *VKORC1* enzyme of rodents are in accordance with the *in vitro* results with human *VKORC1* gene or *VKORC1* enzyme.

The mutations at positions L128 and Y139 are the major mutations of the Norway rat. Moreover, the studies on the Y139F mutations have shown that the resistance factor of this mutation is conserved between *in vivo* and *in vitro* assays [55, 58]. In rats, these mutations involve resistance factors against warfarin, which are of 8 for the L128Q mutation and greater than 200 for the Y139 mutations [58]. Moreover, in rats, L128Q does not seem to diminish the VKOR activity while Y139F does it. Conversely, in humans, the L128R mutation conducts to a reduction of more than 90% of the VKOR activity in enzymatic assay, with the *VKORC1* enzyme produced in yeasts or HEK cells [32, 88]. But, this mutation does not modify the level of gamma-carboxylation in cell assay [40, 84]. Possible origins of these discrepancies are argued in Section 3.3. Consequently, it is currently difficult to conclude on the possible resistance linked with the L128R mutation in humans.

As aforementioned, some mutations decrease the efficiency of the VKOR activity. Matagrín has studied the origins of this loss of efficiency for the Y139 mutation [135]. He showed that Y139 mutations involve a diminution of the VKOR activity and the creation of inactive vitamin K metabolites (3-OH vitamin K) which are eliminated. This induces an increase of the food requirements of vitamin K in rodents carrying these mutations [136, 137]. In humans, the influence of coding mutations on nutritional requirement of vitamin K has not been well studied [22]. However, by analogy with rodent mutations, human mutations might be involved in cardiovascular diseases without VKA treatment [138]. Thus, the rodents carrying these mutations might be used to model and to better understand the possible consequences of these mutations on the human health.

4.2. Cytochrome-linked resistances

Cytochromes are essential elements in the elimination of xenobiotics. Thus, it would be expected that their polymorphism might result in an origin of resistances. But in human medicine, the cytochrome polymorphism is associated with an increase in the patient's VKA sensibility [93, 97]. Moreover, the polymorphism of CYP2C9 is a key element in the prediction of the VKA treatment dose [97]. Thus, no VKA resistance linked to cytochrome has been described in human medicine.

In rodents, expression profiles of cytochromes are different between sensitive and resistant rats carrying a Y139C mutation on *VKORC1* [139]. Nevertheless, it is difficult to identify the part of the resistance due to *VKORC1* mutation and the one due to the expression profiles of

cytochromes. Nevertheless, one example of warfarin resistance linked to cytochrome has been described without association with VKORC1 mutation in roof rats from Tokyo [140, 141]. This rat population overexpresses the cytochrome 3A2. Thus, the concentration of blood warfarin 1 h after the warfarin administration is eightfold lower in resistant rats. However, it is currently the only reported case of cytochrome-linked resistance.

5. Conclusion

The assessment and the comprehension of the resistance mechanisms are essential in the safety and the efficiency of VKA treatments and in the rodent population management. However, the complexity of the mechanisms and the interactions between them prevent the use of only one studying method. The understanding of the VKA actions and their interaction with individual variability can only be achieved by a multiscale approach which combines humans, rodents, and *in vitro* and *in vivo* knowledge.

Author details

Sébastien Lefebvre, Etienne Benoit and Virginie Lattard*

*Address all correspondence to: virginie.lattard@vetagro-sup.fr

USC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, Marcy l'Etoile, France

References

- [1] Fareed J. Antithrombotic therapy in 2014: Making headway in anticoagulant and antiplatelet therapy. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(2):70–1.
- [2] Kuruvilla M, Gurk-Turner C. A review of warfarin dosing and monitoring. *Proc Bayl Univ Med Cent*. 2001;14(3):305–6.
- [3] Wysowski DK, Nourjah P, Swartz L. Bleeding complications with warfarin use: A prevalent adverse effect resulting in regulatory action. *Arch Intern Med*. 2007;167(13):1414–9.
- [4] Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J*. 1935;29(6):1273–85.
- [5] MacCorquodale DW, Binkley SB, Thayer SA, Doisy EA. On the constitution of vitamin K1. *J Am Chem Soc*. 1939;61(7):1928–9.

- [6] Widhalm JR, Ducluzeau A-L, Buller NE, Elowsky CG, Olsen LJ, Basset GJC. Phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis in plants: Two peroxisomal thioesterases of lactobacillales origin hydrolyze 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coa. *Plant J*. 2012;71(2):205–15.
- [7] Okano T, Shimomura Y, Yamane M, Suhara Y, Kamao M, Sugiura M, et al. Conversion of Phylloquinone (Vitamin K1) into Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Mice two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11270–9.
- [8] Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, et al. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*. 2010;468(7320):117–21.
- [9] Conly JM, Stein K. The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Prog Food Nutr Sci*. 1992;16(4):307–43.
- [10] LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(2):160–8.
- [11] Gijsbers BL, Jie KS, Vermeer C. Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *Br J Nutr*. 1996;76(2):223–9.
- [12] Reboul E, Borel P. Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Prog Lipid Res*. 2011;50(4):388–402.
- [13] Takada T, Yamanashi Y, Konishi K, Yamamoto T, Toyoda Y, Masuo Y, et al. NPC1L1 is a key regulator of intestinal vitamin K absorption and a modulator of warfarin therapy. *Sci Transl Med*. 2015;7(275):275ra23.
- [14] Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(7):2730–3.
- [15] Grip L, Blombäck M, Schulman S. Hypercoagulable state and thromboembolism following warfarin withdrawal in post-myocardial-infarction patients. *Eur Heart J*. 1991;12(11):1225–33.
- [16] Azoulay L, Dell’Aniello S, Simon TA, Renoux C, Suissa S. Initiation of warfarin in patients with atrial fibrillation: Early effects on ischaemic strokes. *Eur Heart J*. 2014;35(28):1881–7.
- [17] Vermeer C, Jie K-SG, Knapen MHJ. Role of vitamin K in bone metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1995;15(1):1–21.
- [18] Ferron M, Lacombe J, Germain A, Oury F, Karsenty G. GGCX and VKORC1 inhibit osteocalcin endocrine functions. *J Cell Biol*. 2015;208(6):761–76.

- [19] Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78–81.
- [20] Ferland G. Vitamin K and the nervous system: An overview of its actions. *Adv Nutr*. 2012;3(2):204–12.
- [21] Booth SL. Roles for vitamin K beyond coagulation. *Annu Rev Nutr*. 2009;29(1):89–110.
- [22] Shearer MJ, Fu X, Booth SL. Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: Current concepts and future research. *Adv Nutr Int Rev J*. 2012;3(2):182–95.
- [23] Pan LC, Price PA. The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(18):6109–13.
- [24] Stanley TB, Jin DY, Lin PJ, Stafford DW. The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J Biol Chem*. 1999;274(24):16940–4.
- [25] Friedman PA, Shia MA, Gallop PM, Griep AE. Vitamin K-dependent gamma-carbon-hydrogen bond cleavage and nonmandatory concurrent carboxylation of peptide-bound glutamic acid residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(7):3126–9.
- [26] Van Horn WD. Structural and functional insights into human vitamin K epoxide reductase and vitamin K epoxide reductase-like1. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(4):357–72.
- [27] Greaves JH, Ayres P. Linkages between genes for coat colour and resistance to warfarin in *Rattus norvegicus*. *Nature*. 1969;224(5216):284–5.
- [28] Wallace ME, MacSwiney FJ. A major gene controlling warfarin-resistance in the house mouse. *J Hyg (Lond)*. 1976;76(2):173–81.
- [29] Fregin A, Rost S, Wolz W, Krebsova A, Muller CR, Oldenburg J. Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood*. 2002;100(9):3229–32.
- [30] Zimmermann A, Matschiner JT. Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. *Biochem Pharmacol*. 1974;23(6):1033–40.
- [31] Li T, Chang C-Y, Jin D-Y, Lin P-J, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*. 2004;427(6974):541–4.
- [32] Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz H-J, et al. Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. 2004;427(6974):537–41.

- [33] Tie J-K, Stafford DW. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*. 2016;14(2):236–47.
- [34] Goodstadt L, Ponting CP. Vitamin K epoxide reductase: Homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci*. 2004;29(6):289–92.
- [35] Silverman RB. Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase. *J Am Chem Soc*. 1981;103(19):5939–41.
- [36] Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Engineering of a recombinant vitamin K-dependent γ -carboxylation system with enhanced γ -carboxyglutamic acid forming capacity evidence for a functional cxxc redox center in the system. *J Biol Chem*. 2005;280(11):10540–7.
- [37] Schulman S, Wang B, Li W, Rapoport TA. Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(34):15027–32.
- [38] Jin D-Y, Tie J-K, Stafford DW. The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines. *Biochemistry (Mosc)*. 2007;46(24):7279–83.
- [39] Rost S, Fregin A, Hünerberg M, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: Evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost*. 2005;94(4):780–6.
- [40] Tie J-K, Jin D-Y, Tie K, Stafford DW. Evaluation of warfarin resistance using TALENs-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells. *J Thromb Haemost JTH*. 2013;11(8):1556–64.
- [41] Czogalla KJ, Watzka M, Oldenburg J. Structural modeling insights into human VKORC1 phenotypes. *Nutrients*. 2015;7(8):6837–51.
- [42] Tie J-K, Jin D-Y, Stafford DW. Human vitamin K epoxide reductase and its bacterial homologue have different membrane topologies and reaction mechanisms. *J Biol Chem*. 2012;287(41):33945–55.
- [43] Hamed A, Matagrín B, Spohn G, Prouillac C, Benoit E, Lattard V. VKORC1L1, an enzyme rescuing the vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J Biol Chem*. 2013;288(40):28733–42.
- [44] Melé M, Ferreira PG, Reverter F, DeLuca DS, Monlong J, Sammeth M, et al. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science*. 2015;348(6235):660–5.
- [45] Caspers M, Czogalla KJ, Liphardt K, Müller J, Westhofen P, Watzka M, et al. Two enzymes catalyze vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in mouse: VKORC1 is highly expressed in exocrine tissues while VKORC1L1 is highly expressed in brain. *Thromb Res*. 2015;135(5):977–83.

- [46] Oldenburg J, Watzka M, Bevens CG. VKORC1 and VKORC1L1: Why do vertebrates have two vitamin K 2,3-epoxide reductases? *Nutrients*. 2015;7(8):6250–80.
- [47] Huebner CF, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease VI. The synthesis of the δ -diketone derived from the hemorrhagic agent through alkaline degradation. *J Biol Chem*. 1941;138(2):529–34.
- [48] Bellis DM. Metabolism of coumarin and related compounds in cultures of penicillium species. *Nature*. 1958;182:806–7.
- [49] Goplen BP. Sweetclover production and agronomy. *Can Vet J*. 1980;21(5):149–51.
- [50] Miyoshi I, Paul LK, Stahmann MA. 3-substituted 4-hydroxycoumarin and process of making it [Internet]. US2427578 A, 1947 [cité 27 mars 2015]. Disponible sur: <http://www.google.fr/patents/US2427578>
- [51] Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B, Billeret M, Berny P, Benoit E. Warfarin resistance in a French strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2006;19(6):379–85.
- [52] Lorusso DJ, Suttie JW. Warfarin binding to microsomes isolated from normal and warfarin-resistant rat liver. *Mol Pharmacol*. 1972;8(2):197–203.
- [53] Bevens CG, Krettler C, Reinhart C, Tran H, Koßmann K, Watzka M, et al. Determination of the warfarin inhibition constant K_i for vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) using an *in vitro* DTT-driven assay. *Biochim Biophys Acta BBA – Gen Subj*. 2013;1830(8):4202–10.
- [54] Thijssen HHW. Warfarin resistance: Vitamin K epoxide reductase of scottish resistance genes is not irreversibly blocked by warfarin. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(17):2753–7.
- [55] Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Berny P, Benoit E. Consequences of the Y139F VKORC1 mutation on resistance to AVKs: In-vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(10):742–50.
- [56] Watzka M, Geisen C, Bevens CG, Sittinger K, Spohn G, Rost S, et al. Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: Insights into improved patient diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost*. 2011;9(1):109–18.
- [57] Asher G, Dym O, Tsvetkov P, Adler J, Shaul Y. The crystal structure of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 in complex with its potent inhibitor dicoumarol. *Biochemistry (Mosc)*. 2006;45(20):6372–8.
- [58] Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E, Lattard V. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys*. 2011;515(1–2):14–20.

- [59] Czogalla KJ, Biswas A, Wendeln A-C, Westhofen P, Müller CR, Watzka M, et al. Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces. *Blood*. 2013;122(15):2743–50.
- [60] Kaminsky LS, Zhang Z-Y. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther*. 1997;73(1):67–74.
- [61] Rettie AE, Korzekwa KR, Kunze KL, Lawrence RF, Eddy AC, Aoyama T, et al. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: A role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(1):54–9.
- [62] Breckenridge A, Orme M, Wesseling H, Lewis RJ, Gibbons R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of warfarin in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1974;15(4):424–30.
- [63] O'Reilly RA. Studies on the optical enantiomorphs of warfarin in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1974;16(2):348–54.
- [64] Takahashi DH, Echizen H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2012;40(8):587–603.
- [65] Black DJ, Kunze KL, Wienkers LC, Gidal BE, Seaton TL, McDonnell ND, et al. Warfarin-fluconazole. II. A metabolically based drug interaction: *In vivo* studies. *Drug Metab Dispos*. 1996;24(4):422–8.
- [66] Kunze KL, Trager WF. Warfarin-fluconazole. III. A rational approach to management of a metabolically based drug interaction. *Drug Metab Dispos*. 1996;24(4):429–35.
- [67] Wells PS, Holbrook AM, Crowther NR, Hirsh J. Interactions of warfarin with drugs and food. *Ann Intern Med*. 1994;121(9):676–83.
- [68] Takahashi H, Kashima T, Kimura S, Murata N, Takaba T, Iwade K, et al. Pharmacokinetic interaction between warfarin and a uricosuric agent, bucolome: Application of *in vitro* approaches to predicting *in vivo* reduction of (s)-warfarin clearance. *Drug Metab Dispos*. 1999;27(10):1179–86.
- [69] Boyle CM. Case of apparent resistance of *rattus norvegicus berkenhout* to anticoagulant poisons. *Nature*. 1960;188(4749):517–517.
- [70] Gill JE, Kerins GM, Langton SD, MacNicoll AD. Blood-clotting response test for bromadiolone resistance in norway rats. *J Wildl Manag*. 1994;58(3):454–61.
- [71] Macnicoll AD, Gill JE. Revised methodology for a blood-clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *EPPO Bull*. 1993;23(4):701–7.
- [72] Gill JE, Kerins GM, Langton SD, Macnicoll AD. The development of a blood clotting response test for discriminating between difenacoum-resistant and susceptible

- Norway rats (*Rattus norvegicus*, berk.). *Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol*. 1993;104(1):29–36.
- [73] Prescott CV. A Reappraisal of Blood Clotting Response Tests for Anticoagulant Resistance and a proposal for a standardised BCR Test Methodology. Brussel: CropLife international; 2003. 21 p. (Rodenticide Resistance Action Committee).
- [74] Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *The Lancet*. 1999;353(9154):717–9.
- [75] Tishler M, Fieser LF, Wendler NL. Hydro, Oxido and other derivatives of vitamin K1 and related compounds. *J Am Chem Soc*. 1940;62(10):2866–71.
- [76] MacNicol AD, Nadian AK, Townsend MG. Inhibition by warfarin of liver microsomal vitamin K-reductase in warfarin-resistant and susceptible rats. *Biochem Pharmacol*. 1984;33(8):1331–6.
- [77] Begent LA, Hill AP, Steventon GB, Hutt AJ, Pallister CJ, Cowell DC. Characterization and purification of the vitamin K1 2,3 epoxide reductase system from rat liver. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53(4):481–6.
- [78] Guenther TM, Cai D, Wallin R. Co-purification of microsomal epoxide hydrolase with the warfarin-sensitive vitamin K1 oxide reductase of the vitamin K cycle. *Biochem Pharmacol*. 1998;55(2):169–75.
- [79] Chu P-H, Huang T-Y, Williams J, Stafford DW. Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(51):19308–13.
- [80] Jaenecke F, Friedrich-Epler B, Parthier C, Stubbs MT. Membrane composition influences the activity of *in vitro* refolded human vitamin K epoxide reductase. *Biochemistry (Mosc)*. 2015;54(42):6454–61.
- [81] Banères J-L, Mesnier D, Martin A, Joubert L, Dumuis A, Bockaert J. Molecular characterization of a purified 5-HT₄ receptor a structural basis for drug efficacy. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20253–60.
- [82] Krettler C, Bevans CG, Reinhart C, Watzka M, Oldenburg J. Tris(3-hydroxypropyl)phosphine is superior to dithiothreitol for *in vitro* assessment of vitamin K 2,3-epoxide reductase activity. *Anal Biochem*. 2015;474:89–94.
- [83] Tie J-K, Jin D-Y, Straight DL, Stafford DW. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. *Blood*. 2011;117(10):2967–74.
- [84] Fregin A, Czogalla KJ, Gansler J, Rost S, Taverna M, Watzka M, et al. A new cell culture-based assay quantifies vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1 function and reveals warfarin resistance phenotypes not shown by the dithiothreitol-driven VKOR assay. *J Thromb Haemost*. 2013;11(5):872–80.

- [85] Haque JA, McDonald MG, Kulman JD, Rettie AE. A cellular system for quantitation of vitamin K cycle activity: Structure-activity effects on vitamin K antagonism by warfarin metabolites. *Blood*. 2014;123(4):582–9.
- [86] Aktimur A, Gabriel MA, Gailani D, Toomey JR. The factor IX γ -carboxyglutamic acid (gla) domain is involved in interactions between factor IX and factor XIa. *J Biol Chem*. 2003;278(10):7981–7.
- [87] Müller E, Keller A, Fregin A, Müller CR, Rost S. Confirmation of warfarin resistance of naturally occurring VKORC1 variants by coexpression with coagulation factor IX and in silico protein modelling. *BMC Genet*. 2014;15:17.
- [88] Hodroge A, Matagrín B, Moreau C, Fourel I, Hammed A, Benoit E, et al. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J Thromb Haemost*. 2012;10(12):2535–43.
- [89] Sun Y-M, Jin D-Y, Camire RM, Stafford DW. Vitamin K epoxide reductase significantly improves carboxylation in a cell line overexpressing factor X. *Blood*. 2005;106(12):3811–5.
- [90] Wajih N, Hutson SM, Owen J, Wallin R. Increased production of functional recombinant human clotting factor IX by baby hamster kidney cells engineered to overexpress VKORC1, the vitamin K 2,3-epoxide-reducing enzyme of the vitamin K cycle. *J Biol Chem*. 2005;280(36):31603–7.
- [91] Hallgren KW, Qian W, Yakubenko AV, Runge KW, Berkner KL. r-VKORC1 expression in factor IX BHK cells increases the extent of factor IX carboxylation but is limited by saturation of another carboxylation component or by a shift in the rate-limiting step. *Biochemistry (Mosc)*. 2006;45(17):5587–98.
- [92] Gaio V, Picanço I, Nunes B, Fernandes A, Mendonça F, Horta Correia F, et al. Pharmacogenetic profile of a South Portuguese population: Results from the pilot study of the European Health Examination Survey in Portugal. *Public Health Genomics*. 2015;18(3):139–50.
- [93] Giri AK, Khan NM, Grover S, Kaur I, Basu A, Tandon N, et al. Genetic epidemiology of pharmacogenetic variations in CYP2C9, CYP4F2 and VKORC1 genes associated with warfarin dosage in the Indian population. *Pharmacogenomics*. 2014;15(10):1337–54.
- [94] Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. 2005;352(22):2285–93.
- [95] Limdi NA, Beasley TM, Crowley MR, Goldstein JA, Rieder MJ, Flockhart DA, et al. VKORC1 polymorphisms, haplotypes and haplotype groups on warfarin dose among African-Americans and European-Americans. *Pharmacogenomics*. 2008;9(10):1445–58.

- [96] Shahin MHA, Cavallari LH, Perera MA, Khalifa SI, Misher A, Langae T, et al. VKORC1 Asp36Tyr geographic distribution and its impact on warfarin dose requirements in Egyptians. *Thromb Haemost.* 2013;109(6):1045–50.
- [97] Scott SA, Edelmann L, Kornreich R, Desnick RJ. Warfarin pharmacogenetics: CYP2C9 and VKORC1 genotypes predict different sensitivity and resistance frequencies in the ashkenazi and sephardi jewish populations. *Am J Hum Genet.* 2008;82(2):495–500.
- [98] Aklillu E, Leong C, Loebstein R, Halkin H, Gak E. VKORC1 Asp36Tyr warfarin resistance marker is common in Ethiopian individuals. *Blood.* 2008;111(7):3903–4.
- [99] Sominsky S, Korostishevsky M, Kurnik D, Aklillu E, Cohen Y, Ken-Dror G, et al. The VKORC1 Asp36Tyr variant and VKORC1 haplotype diversity in Ashkenazi and Ethiopian populations. *J Appl Genet.* 2014;55(2):163–71.
- [100] Mitchell C, Gregersen N, Krause A. Novel CYP2C9 and VKORC1 gene variants associated with warfarin dosage variability in the South African black population. *Pharmacogenomics.* 2011;12(7):953–63.
- [101] Cen H-J, Zeng W-T, Leng X-Y, Huang M, Chen X, Li J-L, et al. CYP4F2 rs2108622: A minor significant genetic factor of warfarin dose in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Br J Clin Pharmacol.* 2010;70(2):234–40.
- [102] Suarez-Kurtz G, Botton MR. Pharmacogenomics of warfarin in populations of African descent. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(2):334–46.
- [103] Harrington DJ, Underwood S, Morse C, Shearer MJ, Tuddenham EGD, Mumford AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost.* 2005;93(1):23–6.
- [104] Scott SA, Jaremko M, Lubitz SA, Kornreich R, Halperin JL, Desnick RJ. CYP2C9*8 is prevalent among African-Americans: Implications for pharmacogenetic dosing. *Pharmacogenomics.* 2009;10(8):1243–55.
- [105] Harrington DJ, Gorska R, Wheeler R, Davidson S, Murden S, Morse C, et al. Pharmacodynamic resistance to warfarin is associated with nucleotide substitutions in VKORC1. *J Thromb Haemost.* 2008;6(10):1663–70.
- [106] Bodin L, Perdu J, Diry M, Horellou M-H, Lorient M-A. Multiple genetic alterations in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene (VKORC1) can explain the high dose requirement during oral anticoagulation in humans. *J Thromb Haemost.* 2008;6(8):1436–9.
- [107] Peoc'h K, Pruvot S, Gourmel C, Dit Sollier CB, Drouet L. A new VKORC1 mutation leading to an isolated resistance to fluindione. *Br J Haematol.* 2009;145(6):841–3.
- [108] Harrington DJ, Siddiq S, Allford SL, Shearer MJ, Mumford AD. More on: Endoplasmic reticulum loop VKORC1 substitutions cause warfarin resistance but do not diminish

gamma-carboxylation of the vitamin K-dependent coagulation factors. *J Thromb Haemost.* 2011;9(5):1093–5.

- [109] D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Perna PD, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood.* 2005;105(2):645–9.
- [110] Loebstein R, Dvoskin I, Halkin H, Vecsler M, Lubetsky A, Rechavi G, et al. A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood.* 2007;109(6):2477–80.
- [111] Anton AI, Cerezo-Manchado JJ, Padilla J, Perez-Andreu V, Corral J, Vicente V, et al. Novel associations of VKORC1 variants with higher acenocoumarol requirements. *PLoS One.* 2013;8(5):e64469.
- [112] Shuen AY, Wong BYL, Fu L, Selby R, Cole DEC. Evaluation of the warfarin-resistance polymorphism, VKORC1 Asp36Tyr, and its effect on dosage algorithms in a genetically heterogeneous anticoagulant clinic. *Clin Biochem.* 2012;45(6):397–401.
- [113] Schmeits PCJ, Hermans MHA, Van Geest-Daalderop JHH, Poodt J, De Sauvage Nolting PRW, Conemans JMH. VKORC1 mutations in patients with partial resistance to phenprocoumon. *Br J Haematol.* 2010;148(6):955–7.
- [114] Wilms EB, Touw DJ, Conemans JMH, Veldkamp R, Hermans M. A new VKORC1 allelic variant (p.Trp59Arg) in a patient with partial resistance to acenocoumarol and phenprocoumon. *J Thromb Haemost.* 2008;6(7):1224–6.
- [115] Osman A, Enström C, Arbring K, Söderkvist P, Lindahl TL. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: A retrospective analysis of case records. *J Thromb Haemost.* 2006;4(8):1723–9.
- [116] Bodin L, Horellou MH, Flaujac C, Lorient MA, Samama MM. A vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with vitamin K antagonist resistance. *J Thromb Haemost.* 2005;3(7):1533–5.
- [117] Moreau C, Bajolle F, Siguret V, Lorient M-A, Bonnet D. Genetic resistance to warfarin therapy masked by amiodarone in a 2-year-old girl with mitral valve replacement. *J Thromb Haemost.* 2013;11(3):555–72.
- [118] Orsi FA, Annichino Bizzacchi JM, de Paula EV, Ozelo MC, Langley MR, Weck KE. VKORC1 V66M mutation in African Brazilian patients resistant to oral anticoagulant therapy. *Thromb Res.* 2010;126(3):e206–10.
- [119] Greaves J. Warfarin-resistant rats. *R Soc Health J.* 1970;90(6):289.
- [120] Greaves JH. Resistance to anticoagulants in rodents. *Pestic Sci.* 1971;2(6):276–9.
- [121] Lund M. Resistance to warfarin in the common Rat. *Nature.* 1964;203(4946):778.

- [122] Lund M. Resistance of rodents to rodenticides. *World Rev Pest Control*. 1967;6(4):131–8.
- [123] Jackson WB, Kaukeinen D. Resistance of wild Norway rats in North Carolina to warfarin rodenticide. *Science*. 1972;176(4041):1343–4.
- [124] Jackson WB, Ashton AD. Case histories of anticoagulant resistance. In: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. Washington, D.C.: National Academies Press; 1986.
- [125] Rost S, Pelz H-J, Menzel S, MacNicoll AD, León V, Song K-J, et al. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet*. 2009;10:4.
- [126] Pelz H-J, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg A-C, Baert K, et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*. 2005;170(4):1839–47.
- [127] Runge M, von Keyserlingk M, Braune S, Becker D, Plenge-Bönig A, Freise JF, et al. Distribution of rodenticide resistance and zoonotic pathogens in Norway rats in Lower Saxony and Hamburg, Germany. *Pest Manag Sci*. 2013;69(3):403–8.
- [128] Grandemange A, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Benoit E, Berny P. Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manag Sci*. 2010;66(3):270–6.
- [129] Buckle A. Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Pest Manag Sci*. 2013;69(3):334–41.
- [130] Haniza MZH, Adams S, Jones EP, MacNicoll A, Mallon EB, Smith RH, et al. Large-scale structure of brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in England: Effects on rodenticide resistance. *Peer J*. 2015;3:e1458.
- [131] Berny P, Fourel I, Lattard V. Anticoagulant rodenticides: Resistance and residues in Norway rats in France. *Vertebr Pest Conf*. 2014;342–6.
- [132] Pelz H-J. Resistance-problems in control of rats and house mice with anticoagulants. *Gesunde Pflanz Ger FR*. 1990;42(12):435.
- [133] Pelz H-J, Rost S, Müller E, Esther A, Ulrich RG, Müller CR. Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Manag Sci*. 2012;68(2):254–9.
- [134] Goulois J, Chapuzet A, Lambert V, Chatron N, Tchertanov L, Legros L, et al. Evidence of a target resistance to antivitamin K rodenticides in the roof rat *Rattus rattus*: Identification and characterisation of a novel Y25F mutation in the VKORC1 gene. *Pest Manag Sci*. 2016;72(3):544–50.
- [135] Matagrín B, Hodroge A, Montagut-Romans A, Andru J, Fourel I, Besse S, et al. New insights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) – The

catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explain the biological cost associated to mutations. *FEBS Open Biol.* 2013;3:144–50.

- [136] Greaves JH, Ayres P. Warfarin resistance and vitamin K requirement in the rat. *Lab Anim.* 1973;7(2):141–8.
- [137] Markussen MD, Heiberg A-C, Nielsen R, Leirs H. Vitamin K requirement in Danish anticoagulant-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Pest Manag Sci.* 2003;59(8): 913–20.
- [138] Kohn MH, Price RE, Pelz H-J. A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant VKORC1 mutant rats. *Artery Res.* 2008;2(4):138–47.
- [139] Markussen MD, Heiberg A-C, Fredholm M, Kristensen M. Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: A possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance. *Pest Manag Sci.* 2008;64(3):239–48.
- [140] Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, et al. Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(1):62–6.
- [141] Sugano S, Kobayashi T, Tanikawa T, Kawakami Y, Kojima H, Nakamura K, et al. Suppression of CYP3A2 mRNA expression in the warfarin-resistant roof rat, *Rattus rattus*: Possible involvement of cytochrome P450 in the warfarin resistance mechanism. *Xenobiotica.* 2001;31(7):399–407.

INTECH

II.3.7 Les opportunités de nouveaux anticoagulants anti-vitamines K d'origine naturelle

Le premier AVK mis en évidence, le dicoumarol, était d'origine naturelle [83]. Par la suite, les principaux AVK ont eu une origine synthétique. Cependant, la majorité des molécules utilisées sont l'objet de résistances ou ont une durée d'élimination importante [182]. Les longues demi-vies des anticoagulants récents peuvent conduire à des intoxications secondaires d'animaux non cibles comme des renard, certains rapaces ou des carnivores domestiques, notamment les chats, qui mangent les rongeurs intoxiqués et ainsi s'intoxiquent eux-mêmes [93, 155]. Or y a une volonté sociétale de plus en plus forte, pour diminuer la rémanence des molécules dans l'environnement et de limiter les intoxications secondaires. Il est intéressant de se pencher sur les AVK d'origine naturelle et d'évaluer s'ils possèdent les qualités recherchées, à savoir, une bonne activité sur les rongeurs résistants et une faible rémanence. L'une des plantes synthétisant des AVK est la grande fêrule. La suite de ce chapitre présente les connaissances sur la grande fêrule et les AVK qu'elle contient.

II.3.7.1 La grande fêrule (*Ferula communis* L.) aspect botanique

Le genre *Ferula* appartient à la famille des apiacés et regroupe plus de 170 espèces. Les fêrules sont principalement présentes dans le pourtour méditerranéen et en Asie centrale. Concernant la grande fêrule (*Ferula Communis* L.), c'est une plante vivace à tige creuse pouvant atteindre 3 à 4 m de haut, les feuilles de la base sont pétiolées et peuvent mesurer 60cm, les feuilles supérieures sont en forme de bateau [68]. Les deux types de feuilles sont glabres. Les fleurs sont jaunes et organisées en ombelles (Figure 12). Le fruit de la fêrule apparait en été et est brun foncé.



Figure 12 : photographie d'une grande fêrule (Gilbert Gault)

II.3.7.2 Molécules d'intérêt synthétisées par la grande fêrule

Deux chémotypes de grande fêrule ont été décrits. L'un est décrit comme étant toxique et l'autre non. Les deux chémotypes ne sont pas morphologiquement différenciables [150]. Le chémotype non toxique est utilisé en médecine traditionnelle pour ces propriétés aphrodisiaques (présence de composés avec des propriétés oestrogéniques) et antimicrobiennes [6, 126]. Il est à noter que ces propriétés n'ont pas été scientifiquement prouvées.

Concernant le chémotype toxique, il est impliqué dans des intoxications d'animaux de rente [161, 181]. Les animaux intoxiqués présentent des hémorragies importantes. Il est possible de reproduire expérimentalement ces intoxications avec les mêmes symptômes hémorragiques [11]. Il a aussi été montré que la vitamine K pouvait prévenir les effets de ces intoxications [36]. L'ensemble de ces éléments laisse à penser qu'une molécule avec des propriétés anti-vitamines K est responsable des intoxications à la grande fêrule.

Les molécules, pouvant être responsables des symptômes causés par la grande fêrle, ont été identifiées comme étant des dérivés coumariniques : le féruléol (Figure 12 A) et la ferprénine (Figure 12 B) [177]. Cependant, il semblerait que le féruléol ait la plus forte activité anticoagulante. En effet, la présence de cette molécule est le principal élément différenciant les deux chémotypes de grande fêrle [150]. Les propriétés inhibitrices de ces deux molécules sur VKORC1 n'ont pas encore été caractérisées.

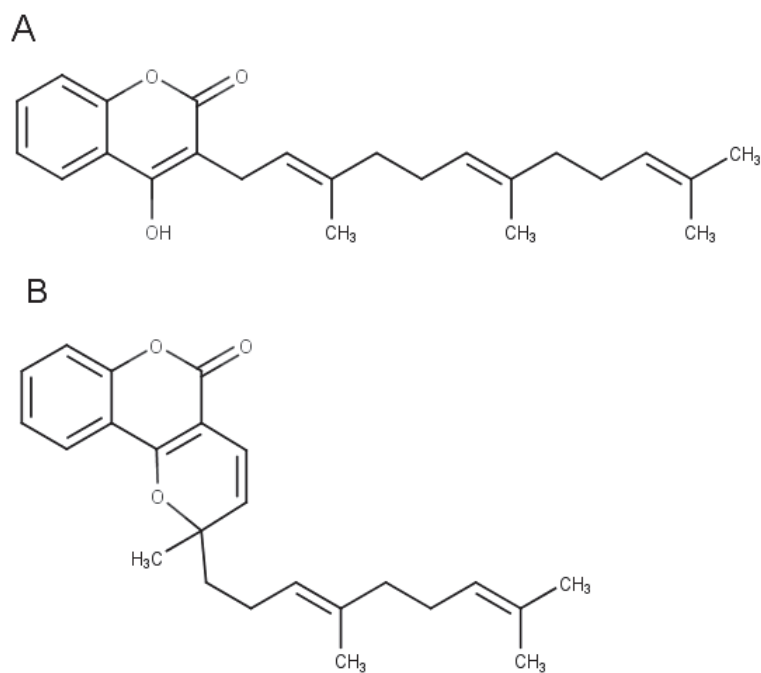


Figure 13 : structure chimique du féruléol (A) et de la ferprénine (B)

II.4 SENSIBILITE AUX ANTI-VITAMINES K LIEE AU SEXE

Depuis quelques années, la prise en compte du sexe, dans les études, est devenue un enjeu clef de la recherche [31, 120, 193]. En effet, le sexe a de nombreuses conséquences sur la physiologie des mammifères notamment sur l'élimination des xénobiotiques [122]. En parallèle de l'impact du sexe sur la pharmacocinétique des anticoagulants, le sexe peut aussi influencer la coagulation elle-même, ce qui modifie la réponse aux anticoagulants. Après avoir présenté les éléments mettant en évidence l'influence du sexe sur la coagulation, les différents mécanismes pouvant expliquer cette différence sont exposés.

II.4.1 Constat de l'influence du sexe sur la sensibilité aux anticoagulants

L'influence du sexe sur la sensibilité aux anticoagulants a été mise en évidence chez le rat, il y a une vingtaine d'années [63, 94]. Cette différence a été, par la suite, confirmée lors de la détermination des doses efficaces 50 [138]. La dose efficace 50 (ED50) est, pour un anticoagulant, la dose nécessaire pour que 50% des individus aient un INR, cinq fois supérieures à la normale, 24 heures après l'administration de cet anticoagulant. Ainsi plus l'ED50 est élevé, moins l'individu est sensible à la molécule. Les valeurs des ED50 des principaux AVK sont reportées dans le Tableau VI. On remarque que pour chaque molécule l'ED50 pour les rats femelles est supérieure à celle des rats mâles, indiquant une plus faible sensibilité des femelles. Par ailleurs, il est intéressant de noter que pour les souris (*Mus musculus*) ce sont les mâles qui sont les plus sensibles.

Tableau VI : Dose efficace 50 (ED50) chez le rat mâle et femelle pour différents anticoagulants anti-vitamines K [138].

MOLECULES	ED50 RATS MÂLES (MG.KG ⁻¹)	ED50 RATS FEMELLES (MG.KG ⁻¹)
Coumafène	1,5	2,1
Bromadiolone	0,5	0,6
Diféthialone	0,4	0,5
Difénacoum	0,6	0,8

En médecine humaine, les femmes ont un risque plus important que les hommes de développer des effets secondaires hémorragiques lors de traitement aux anticoagulants anti-vitamines K [1]. De plus, la dose pour maintenir une bonne anticoagulation est plus faible pour les femmes [59, 191]. Ce qui semble indiquer une plus grande sensibilité des femmes aux AVK à l'inverse des rats femelles.

II.4.2 Paramètres de la coagulation vitamine K dépendante influencés par le sexe

II.4.2.1 La coagulation basale

Concernant la coagulation physiologique, les études des nombreuses valeurs disponibles en médecine humaine ont permis de mettre en évidence une différence dans les temps de coagulation entre les hommes et les femmes.

Dans une étude pour déterminer les valeurs seuils du temps de Quick et du temps de céphaline kaolin sur plus de 13 000 tests, une différence significative a été mise en évidence entre les hommes et les femmes, pour le temps de Quick [12]. Dans cette étude, les femmes présentent un temps de Quick plus faible, cela peut laisser penser que la voie du facteur tissulaire de leur coagulation est plus efficace. D'autres études mettent en évidence une concentration en prothrombine et en facteur VII, IX et X plus importante chez les femmes [49, 87].

Chez les animaux de laboratoire, des différences significatives entre les sexes ont été décrites chez le rat (lignée Wistar) et la souris, pour le temps de Quick et de céphaline kaolin. Contrairement à ce qui est décrit chez l'humain, le temps de Quick des femelles est plus élevé que celui des mâles, dans ces deux espèces. A l'inverse, le temps de céphaline kaolin est plus faible chez les femelles des deux espèces [103]. Concernant les facteurs de la coagulation, les activités basales du facteur II et du facteur X sont plus importantes pour les rats femelles que pour les mâles [90].

II.4.2.2 Le métabolisme des xénobiotiques

Le métabolisme des xénobiotiques est un élément majeur pouvant expliquer des différences de réponse à un traitement d'un individu à l'autre. Les deux étapes majeures pouvant influencer la pharmacocinétique d'un xénobiotique sont l'absorption et l'élimination. Il a été mis en évidence que les pharmacocinétiques des AVK sont différentes chez les mâles et les femelles. En médecine humaine, les femmes traitées avec un AVK ont une concentration sanguine en cet AVK plus importante que celle des hommes pour une même posologie [97]. De même, pour ce qui est du rat, suite à une administration de warfarine l'aire sous la courbe de la concentration sanguine en warfarine des rats femelles est plus importante que celle des mâles [194].

Dans le cas des AVK, le mécanisme d'absorption est mal connu et peu de variabilités au niveau de l'absorption ont été reportées [154]. Ainsi, c'est au niveau de l'élimination des AVK que ces différences de pharmacocinétique peuvent trouver leur explication. L'importance des mutations sur le cytochrome P450 2C9 (CYP2C9), responsable de l'élimination de la warfarine chez l'homme, dans la pharmacocinétique des AVK, a été présentée précédemment. Mais, en plus des mutations, le niveau d'expression des cytochromes pourrait aussi influencer sur la pharmacocinétique. Or, le sexe des individus influence l'expression des gènes des cellules somatiques [85]. Pour ce qui concerne le cytochrome CYP2C9 chez l'homme, des résultats contradictoires ont été obtenus. Certains présentent une plus grande activité du cytochrome chez l'homme que chez la femme [152] d'autres l'inverse [117] et enfin certains résultats ne reportent aucune différence [133]. Actuellement la différence de pharmacocinétique n'est pas encore expliquée chez l'homme.

Pour ce qui concerne les rats, un fort dimorphisme sexuel existe en ce qui concerne les cytochromes dégradant les AVK. De plus, à la suite l'administration d'un AVK, les cytochromes inhibés et induits sont différents entre les mâles et les femelles [111]. Ces éléments pourraient expliquer la différence de pharmacocinétique entre les sexes. Cependant les connaissances actuelles sur la métabolisation des AVK ne sont pas suffisantes pour confirmer cette hypothèse. Il est remarquable que la différence de pharmacocinétique observée chez le rat avec la warfarine ne permette pas d'expliquer la moins forte sensibilité des femelles aux AVK. Cependant, il faudra confirmer cette observation avec d'autres AVK.

Enfin, les résultats obtenus chez le rat peuvent expliquer les difficultés d'étude des différences d'activité du CYP2C9 entre homme et femme. En effet, les AVK semblent moduler différemment l'expression des cytochromes en fonction du sexe. Il faudrait ainsi étudier l'impact de la warfarine sur l'expression du CYP2C9 pour l'homme et la femme afin de pouvoir conclure sur l'implication d'un différentiel d'activité de CYP2C9 sur les différences de pharmacocinétique observées.

II.4.2.3 L'activité du cycle de la vitamine K

Le niveau d'expression des enzymes, impliquées dans le cycle de la vitamine K, peut aussi jouer sur la sensibilité aux AVK. Par exemple, si le gène de l'enzyme VKORC1 est plus exprimé, une dose plus importante d'AVK pourrait être nécessaire pour obtenir la même activité résiduelle. Il a été montré, chez l'homme, qu'une mutation du promoteur de *Vkorc1* double l'expression de ce même gène et entraîne un phénotype résistant aux AVK [189]. Une expérience sur les souris (*Mus musculus*) a montré un dimorphisme sexuel au niveau de l'expression de la VKORC1. En effet, le gène *vkorc1* est plus exprimé dans le foie des souris mâles que dans celui des femelles [70]. Ce dimorphisme n'a pas été étudié chez le rat.

En plus du niveau basal d'expression, un dimorphisme dû à l'induction de certains gènes pourrait apparaître à la suite de l'administration d'un AVK. L'induction de l'expression de certains gènes, suite à l'administration d'un AVK, a été étudiée chez le rat : *vkorc1*, *nqo1* et caluménine. Une différence significative a été mise en évidence pour la caluménine qui est plus exprimée chez les mâles et les femelles après l'administration de bromadiolone [110]. La caluménine est une protéine chaperonne qui protégerait VKORC1 des anticoagulants anti-vitamines K [188]. Cependant, l'étude de Markussen semble exclure la caluménine pour expliquer la plus grande tolérance des rats femelles aux AVK.

II.4.2.4 La demi-vie des facteurs de la coagulation vitamine K dépendant

La demi-vie des facteurs de la coagulation à la suite de l'administration d'une dose de bromadiolone a été étudiée en partie par MacNicoll. Son étude n'a cependant pas mis en évidence de différence significative entre les demi-vies des facteurs de la coagulation des rats mâles et des femelles [90]. Cependant, l'étude suit les facteurs de la coagulation sur moins de 10 heures, ne prend en compte que peu de points et n'étudie pas la demi-vie du facteur IX. Ainsi, ce résultat devrait être confirmé.

II.4.2.5 Le stockage de la vitamine K

Les capacités de stockage de la vitamine K pourraient aussi jouer un rôle dans la différence de sensibilité entre les mâles et les femelles aux AVK. En effet, les rats femelles ont des stocks de vitamine K plus importants que les mâles [81, 82]. De plus, les profils de vitamine K (proportion de phylloquinone et des différentes ménaquinones) dans les tissus sont différents entre les mâles et les femelles rats ou souris [70, 82]. Enfin, il semblerait que les femelles utilisent plus efficacement la vitamine K.

III. PARTIE EXPERIMENTALE DE L'ETUDE DE L'IMPACT DU SEXE SUR LA COAGULATION VITAMINE K DEPENDANTE CHEZ LE RAT.

III.1 OBJECTIFS

L'influence du genre sur la sensibilité aux anticoagulants a été mise en évidence chez le rat, il y a une vingtaine d'années [63, 94]. Cette différence a été par la suite confirmée lors de la détermination des doses efficaces 50 [138]. Cependant, l'origine de cette différence n'a pas été établie. **Le but premier de notre travail est d'étudier les possibles origines de la différence de sensibilité aux AVK entre les rats mâles et femelles.**

L'analyse bibliographique nous a permis d'établir quatre hypothèses principales sur l'origine de cette différence :

- i) Le système enzymatique régénérant la vitamine K est plus efficace ou est moins sensible aux AVK chez les femelles comparées aux mâles.
- ii) La coagulation basale des femelles est plus efficace que celle des mâles, les facteurs de la coagulation seraient plus concentrés chez les femelles, ainsi le seuil critique de concentration des facteurs serait franchi plus tardivement.
- iii) La demi-vie des facteurs de la coagulation est plus longue chez les femelles. De la même façon que pour l'hypothèse précédente, une demi-vie des facteurs de la coagulation plus longue impliquerait que le seuil critique de concentration des facteurs serait franchi plus tardivement.
- iv) L'anticoagulant est métabolisé différemment entre les mâles et les femelles. Entraînant ainsi une quantité d'anticoagulant moins importante dans les hépatocytes et la circulation sanguine des femelles par rapport aux mâles. Ce point qui a été étudié pour les anticoagulants de première génération (warfarine) n'a pas été analysé pour les molécules plus récentes [194].

Afin d'étudier chacune des hypothèses, nous avons divisé notre étude en deux phases : une étude in vitro sur les microsomes de foies pour étudier l'efficacité du système enzymatique de régénération de la vitamine K, et une étude in vivo pour étudier le niveau basal et la décroissance des facteurs de la coagulation.

III.2 STRATEGIE

La stratégie développée pour étudier les différentes hypothèses sur l'origine de la plus grande tolérance aux anticoagulants des rats femelles est présentée dans la Figure 14. En ce qui concerne les deux premières hypothèses, leur mise en place est bien décrite et maîtrisée par notre laboratoire. Les tissus (foie et sang) sont prélevés sur des rats mâles et femelles, puis analysés (article 3). Pour ce qui concerne l'étude de la coagulation après administration d'un anticoagulant anti-vitamine K, nous avons dû, d'abord, étudier les différentes méthodes d'exploration de la coagulation afin de déterminer lesquelles sont les plus pertinentes pour étudier la coagulation vitamine K dépendante (article 1 et 2). Enfin, nous avons comparé l'évolution de la coagulation, de l'activité des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants et de la concentration hépatique en AVK, suite à l'administration *per os* d'un AVK (article 3).

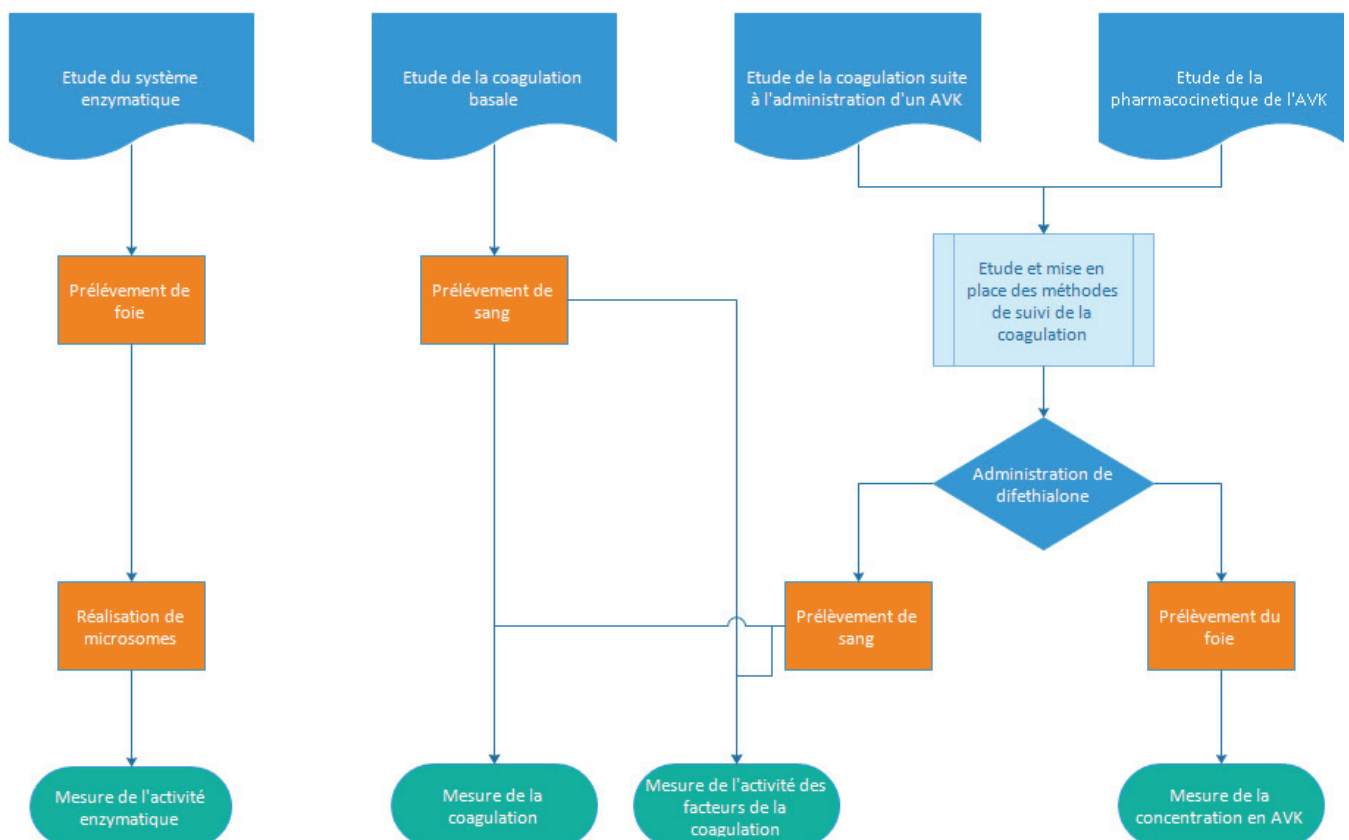


Figure 14: Stratégie pour étudier les différentes hypothèses sur l'origine de la plus grande tolérance aux anticoagulants des rats femelles

III.3 ETUDES

III.3.1 Article 2 (soumis): Suivi de la coagulation vitamine K dépendante chez le rat – vers une évolution de la méthodologie pour détecter la résistance des rats

Titre anglais: Monitoring of antivitamin K-dependent anticoagulation in rats – towards an evolution of the methodology to detect resistance in rats

III.3.1.1 Objectif

De nombreuses techniques de suivi de la coagulation ont été décrites chez le rat. Cependant, elles n'ont jamais été comparées dans un contexte de suivi de la coagulation vitamine K dépendante. Dans cet article, les paramètres de quatre techniques d'analyse de la coagulation (temps de Quick, temps de céphaline kaolin et thromboelastometrie avec de réactifs activant soit la voie endogène de la coagulation : inTEM, soit la voie du facteur tissulaire : exTEM) et l'activité des quatre facteurs de la coagulation vitamine K dépendants (facteur II, VII, IX et X) sont analysés à la suite d'une administration d'un AVK, afin de déterminer quel paramètre permet de suivre le mieux les effets de l'AVK.

III.3.1.2 Protocole

Pour cette expérience à 35 rats mâles ont été nourris avec une alimentation carencée en vitamine K3 durant l'expérience, et ce depuis au moins 48 heures avant l'administration de la diféthialone ou de la mise à mort du premier groupe. Un premier groupe de 8 rats mâles est mis à mort 48 heures après le début de l'alimentation carencée dans le but de définir les paramètres basaux. Après une même période d'alimentation carencée, une administration de 10 mg/kg de diféthialone *per os* est réalisée sur les autres rats. Ensuite, 1, 2, 4, 8, 10, 13, 16, 20 et 24 heures après l'administration de diféthialone, un groupe de trois mâles est mis à mort dans le but d'étudier l'évolution des paramètres de la coagulation sanguine.

De plus, pour étudier la corrélation entre les facteurs de la coagulation et les paramètres de la coagulation nous avons mesuré les mêmes paramètres sur 33 rats mâles qui ayant subi le même protocole. Cependant, 48 heures après l'administration de diféthialone, de la vitamine K est administrée per os aux rats. Ensuite, 135, 150, 165, 180, 210, 240, 270, 330, 360, 720 et 1440 minutes après l'administration de vitamine K, un groupe de trois mâles est mis à mort dans le but d'étudier l'évolution des paramètres de la coagulation sanguine.

III.3.1.3 Principaux résultats

Cette expérience a permis de déterminer les avantages et inconvénients des 8 techniques étudiées. Un résumé des caractéristiques des différentes techniques est présent dans le Tableau VII. De plus, nous avons mis en évidence une corrélation forte entre le temps de Quick et le facteur X. Ces résultats sont l'objet de l'article ci-après.

Tableau VII : résumé des caractéristiques de chacune des techniques employées pour suivre la coagulation vitamine K dépendante à la suite de l'administration d'un AVK chez le rat. Trois caractéristiques, précocité, fiabilité et amplitude d'évolution sont analysées respectivement en fonction du temps de latence, du R² et de la valeur absolue de la pente. (À, applicable, Q, questionnable, N, non applicable)

	Analyse	Paramètre	Applicabilité	Précocité	Fiabilité	Amplitude d'évolution	
Analyses de la coagulation globale	Temps de Quick	Temps de coagulation	A	+	++	+	
	Temps de céphaline kaolin	Temps de coagulation	Q	+	-	-	
		Temps de coagulation	A	-	+	++	
	exTEM	α	N				
		MCF	N				
		CFT	Q	-	-	++	
		TPI	N				
		Temps de coagulation	N				
	inTEM	α	N				
		MCF	N				
		CFT	N				
		TPI	N				
		Facteur II	A	+++	+	+	
	Analyse spécifique	Activité des facteurs de la coagulation	Facteur VII	A	+++	++	+++
			Facteur IX	A	+	-	+
Facteur X			A	++	+++	++	

Monitoring of antivitamin K-dependent anticoagulation in rodents – towards an evolution of the methodology to detect resistance in rodents

Sébastien Lefebvre, Claire Hascoët, Marlène Damin-Pernik, Benoit Rannou, Etienne Benoit, Virginie Lattard*

USC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France

* Corresponding author: Virginie Lattard

USC 1233 INRA-Vetagro Sup 69280 Marcy l'Etoile, France

Email: virginie.lattard@vetagro-sup.fr; Phone: +33-(0)478872727; Fax: +33-(0)478870516

Number of total words : 6163

RUNNING HEAD

Monitoring of antivitamin K-dependent anticoagulation in rodents

ABBREVIATIONS

Activated Partial Thromboplastine time (aPTT) ; Clotting Time (CT) ; Clot formation time (CFT) ; carboxylated glutamate (Gla) ;extrinsic thromboelastometry (exTEM) ; glutamate (Glu) ; gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) ; intrinsic thromboelastometry (inTEM) ; maximum clot firmness (MCF) ; Prothrombin time (PT) ; Thromboelastometry (TEM) ; Thrombodynamic potential index (TPI) ; Vitamin K antagonists (VKA)

ABSTRACT

Vitamin K antagonists are used as rodenticides for pest control management. In rodents, prothrombin time is used to monitor their effect despite its limits and the emergence of many coagulation methods. The aim of this study is to explore different coagulation monitoring methods in order to propose the best method and the best parameter to monitor vitamin K antagonists effect in rodents.

The coagulation function was thus monitored with global coagulation assays and specialty assays after difethialone administration in rats

Despite many parameters obtained by thromboelastometry, only clotting time and clot formation time obtained by ExTEM were modified. Their evolutions were fast with doubling time respectively of 4.0h and 3.7h but their increases were delayed with a lag time higher than 8h. Conversely, prothrombin time evolution presented a lag time of only 2h, but a higher doubling time of 7.2h. The measurements of factor VII and X activities were the most sensitive assays to monitor to vitamin K antagonists effect with almost no lag time and the fastest evolutions. Nevertheless, factor X was shown to be the only key factor driving prothrombin time.

Monitoring factor X activity enables to follow most effectively the anticoagulation status in rats after rodenticides administration.

KEY-WORDS

vitamin K anticoagulants; intoxication monitoring; clotting assay; thromboelastometry; clotting factor activity; rodents

1 INTRODUCTION

For over half century, vitamin K antagonists (VKA) have been used in human medicine in prevention and treatment of thromboembolic disorders and as rodenticides for pests control management. VKA acts as inhibitors of the vitamin K cycle. This cycle is a key component of the blood coagulation. Indeed, four clotting factors of the clotting cascade are vitamin K dependent – i.e. factor II, VII, IX and X. Their activity is conditioned by the gamma-carboxylation of their glutamate residues (Stenflo et al. 1974). The gamma-carboxylation is performed in endoplasmic reticulum of hepatic cell by the enzyme gamma-glutamyl carboxylase with vitamin K as cofactor. For each gamma-carboxylation, vitamin K hydroquinone has to be converted in vitamin K epoxide. Then, vitamin K is regenerated by an enzyme, the Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1). VKA are specific inhibitors of this enzyme (Lasseur et al. 2006) This inhibition blocks the regeneration cycle, diminishing the vitamin K hydroquinone available for the gamma carboxylation of vitamin K dependant glutamate residues. Hence, the vitamin K dependant clotting factors are not functional, impairing the coagulation function.

VKA are used for pests control management because of their delayed action. This delayed action is crucial to success of the population management by avoiding the connection between these two events. . Nevertheless, since the sixties, many cases of VKA resistances have been described (Boyle 1960; J. Greaves 1970; J. H. Greaves 1971). Since this discovery, many resistance mechanisms have been pinpointed. In this way, at least 25 different mutations of the *Vkorc1* gene have been described in Norway rat (*Rattus Norvegicus*), leading to different level of mutations (Rost et al. 2009). Moreover, other resistance mechanisms have been described or suspected, some involving an overexpression of cytochromes P450 (Ishizuka et al. 2007; Markussen et al. 2008) and others with origins still unknown.

With the emergence of many resistance mechanisms to vitamin K antagonists in rodents, the diversity of VKA used for pests control management and the future development of new VKA, the need for proper coagulation testing has emerged. Initially, to evaluate resistance level, VKA efficiency tests were based on a survival challenge after a VKA administration. These challenges were quite long (many days) and have many shortcomings concerning the animal welfare and the repeatability. Later, new methods based on blood clotting response test – i.e., the prothrombin time (PT), have been developed (Gill et al. 1994; Gill et al. 1993; MacNicoll and Gill 1993). This new method reduce the experimentation time to 24 h, but is associated with major issues – i.e., the reproductibility and the repeatability of the test. Indeed, the PT measurement is widely dependent of the thromboplastin used. Thus, to compare the results the same reagent has to be used and this concern has not be completely solved by the use of International Normalized Ratio (Buckle and Smith 2015). Moreover, in human medicine, evolving clinical experience has made practitioners doubting the value of the PT test in the management of VKA anticoagulation (Sølbeck, Ostrowski, and Johansson 2012; Jackson and Esnouf 2005; Segal and Dzik 2005). Therefore, in human medicine, many coagulation tests have been explored to monitor VKA anticoagulation. Recent guidelines suggest the use of thromboelastometry (TEM) in the management of VKA anticoagulation (Spahn et al. 2013). With the diversity of blood clotting tests developed in human medicine, it might be today relevant to explore the interest of these tests to follow an anticoagulation by VKA in rodents to propose a better monitoring solution.

In this study, we monitored VKA anticoagulation by four clotting tests including PT and Activated Partial Thromboplastine time tests (aPTT) and TEM test with two different kind of reagents. We completed this exploration by the measurement of the activity of the four vitamin K dependent clotting factors. Indeed, only gamma-carboxylated vitamin K dependent clotting factors are released in the blood of rats which allow their easy dosing (Harauchi et al. 1986).

Most of these blood clotting parameters have never been assessed or compared before in the perspective of the VKA-dependent coagulation studies. The aim of this study is to compare the kinetic evolution of different blood clotting parameters during the first 24h after the administration of a lethal dose of VKA and to study the possible correlation between the evolutions of these parameters. Our, result might be useful in order to refine the standardized efficiency test of VKA.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 ANIMALS

OFA-Sprague-Dawley rats of 8 weeks (250-300 g) were obtained from a commercial breeder (Charle Rivers, l'Arbresles, France) and acclimated for a minimal period of 5 days. The rats were housed four per cage under a constant photoperiod and ambient temperature. Experimental research was performed following international guidelines on animal welfare with approval from the ethics committee of the Veterinary School of Lyon. Animals were checked every days before difethialone administration and at least every 8 hours after, with a special attention to potential bleeding adverse event. In order to study the decay kinetics of the vitamin K-dependent blood clotting factors after administration of anticoagulants, 8-weeks old OFA-Sprague-Dawley rats (35 males) have been fed with vitamin K₃-deficient food (Reference U8220 Version 231 from Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France), at least 48 hours before the beginning and during the experience. To define the basal levels of blood parameters, a first group of 8 rats were killed 48h after the beginning of the vitamin K₃-deficient feeding. Blood was collected in citrate tubes (3.2%; 1:9 v/v) by intracardiac taking and liver was collected and frozen at -80°C. The other animals received by force-feeding a *per os* administration of 10 mg/kg of difethialone (kindly provided by Liphatech) 48h after the beginning of the vitamin K₃-deficient feeding, then a group of 3 rats was killed 1, 2, 4, 8, 10, 3

13, 16, 20 and 24 hours after the difethialone administration. Blood was collected in citrate tubes (3.2%; 1:9 v/v) by intracardiac taking and liver was collected and frozen at -80°C.

In order to explore the relation between the parameters, additional data were obtained with 33 male rats. They receive the same protocol at the beginning, they have been fed with vitamin K3-deficient food then they have received by force-feeding a *per os* administration of 10 mg/kg of difethialone in the same condition than the other rats. 48h after the difethialone administration rats had received an oral dose of vitamin K (10mg.kg⁻¹). Then a group of 3 rats was killed at 135, 150, 165, 180, 210, 240, 270, 330, 360, 720 and 1440 minutes after the vitamin K administration. Blood was collected in citrate tubes (3.2%; 1:9 v/v) by intracardiac taking and liver was collected and frozen at -80°C.

2.2 CLOTTING TIMES

Activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT) were measured using a STA Compact coagulation analyzer (Diagnostica Stago, Asnières, France) and Diagnostica Stago reagents. For aPTT determination, 100 µL of plasma were incubated at 37°C for 3 min with 100 µL of cephalin and activator (CK Prest, Stago), then 100 µL of 0,025 M CaCl₂ were added and the clotting time was recorded. For PT determination, 100 µL of plasma were added to 200 µL of tissue factor and calcium (Neoplastine, Stago) prewarmed to 37°C and the clotting time was recorded. The device automatically stopped if no clot appeared in 600s.

2.3 THROMBOELASTOMETRY

The measure of thromboelastometry are realized according to the protocol described by (Wohlauer et al. 2011). Analyses were performed using the thromboelastometer Rotem Delta (TEM international GmbH, Munich, Germany) and reagents provided by the manufacturer of the instrument. Those analyses were performed on whole citrated blood 30 minutes after blood

collection according to recommendations. Briefly, 300 μ L of prewarmed (37°C) citrated whole blood samples were added to clotting reagents in the cup. The analyses were then run for 60 minutes. Two types of clotting reagents were used to perform two profiles: intrinsic TEM (inTEMs reagent) to evaluate the intrinsic pathway (with activation by ellagic acid), and extrinsic TEM (exTEMs reagent) to evaluate the extrinsic pathway (with tissue factor activation). For these tests, the following parameters were recorded: clotting time (CT), the time until an amplitude of 2mm; Clot formation time (CFT), the time between 2 mm amplitude and 20 mm amplitude; alpha-angle (α), angle between the baseline and a tangent to the clotting curve through the 2 mm point; maximum clot firmness (MCF), the maximum amplitude reached during the test. Furthermore, 1 parameter based on exTEM and InTEM was calculated: the thrombodynamic potential index (TPI) which shows thrombodynamic potential of the temogram, calculated from maximal clot elasticity (MCE; $MCE = (100 \times MCF)/(100 - MCF)$) using the following equation: $TPI = MCE/CFT$.

2.4 DETERMINATION OF CLOTTING FACTOR CONCENTRATIONS

Vitamin K-dependent clotting factors activities (II, VII, IX, X) were measured on citrated plasma using a chromogenic method on Konelab 30i (Thermoscientific) with Hyphen Biomed reagents.

More precisely, factor II was activated by incubation of citrate plasma with Echis Carinatus venom (0.25 mg/mL) in Tris-buffer (0,1mM Tris Hcl, pH 8.3 at 25°C, 0.2% BSA) at 37°C for 10 min. Thus, 50 μ g of thrombin chromogenic substrate was added and absorbance was monitored at 405 nm for 1 min.

Factor VII activity was assayed by incubation of citrate plasma with calcium and tissue factor in excess to allow formation of tenase complexes and addition of a saturating concentration of human factor X activated in factor Xa proportionally to the quantity of tenase complexes

formed. Thus, activity of factor Xa was monitored at 405 nm for 2 min after the addition of a specific chromogenic substrate generating para-nitroaniline in the presence of factor Xa.

Factor IX activity was assayed by an initial incubation of thrombin, calcium, phospholipids and Factor XIa with citrate plasma. The addition of a second reagent allowed to add factor VIII:C and factor X in the mixture. Thus, 50 µg of thrombin chromogenic substrate was added and absorbance was monitored at 405 nm for 1 min.

Factor X was activated by the addition of Russel's viper venom. Thus, 50 µg of thrombin chromogenic substrate was added and absorbance was monitored at 405 nm for 2 min.

2.5 STATISTICAL ANALYSIS AND MATHEMATICAL MODEL

Statistical analysis were performed with R v. 3.1.2. Results were expressed as mean values \pm SD or fitted value and confidence interval. For the evolution of each parameter against the time after the administration of difethialone, data were linearized with a logarithmic function. For the evolution of each clotting factor against the prothrombin time, clotting factor and prothrombin time were linearized with a logarithmic function. Regression curves were compared on the slope and origin parameters with a Fisher test on the variance. The null hypothesis is that curves have the same slope or the same origin.

3 RESULTS

3.1 ASSESSMENT OF VKA-DEPENDENT HYPOCOAGULABILITY BY COAGULATION ASSAYS

VKA-dependent hypocoagulability was assessed during the first 24 hours following the administration of 10 mg/kg of difethialone by traditional coagulation tests – i.e. PT and Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) and by more global coagulation assay that is TEM using exTEM or inTEM reagents (Figure 1). To facilitate the analysis of each technic,

results were thus represented comparatively to the corresponding results measured before difethialone administration then linearized with the natural logarithm function (Figure 2 and Figure 3). The lag time before a significant modification of the parameter and the slope of parameter evolution after this lag time are resumed in table 1.

The four coagulation assays enabled to obtain a clotting time parameter (Figure 2). Only the clotting time obtained by TEM using the inTEM reagent did not significantly differ from basal level during the first 24 hours ($P=0.693$). The others clotting time present a lag time ranged between 2 hours for PT method and 10 hours for TEM method using the exTEM, then significantly increase. The fastest increase was observed for the evolution of the clotting time obtained by TEM using the exTEM reagent with a slope of 0.179 h^{-1} ($r^2=0.925$). The evolution of the clotting time obtained by PT and aPTT methods were slower with a slope of respectively 0.096 h^{-1} ($r^2=0.972$) and 0.030 h^{-1} ($r^2=0.825$).

In addition of the clotting time, four other parameters were assessed by TEM with exTEM or inTEM reagents. The evolution of CFT, α , MCF and TPI are represented in Figure 3. No significant evolution was observed for any parameters obtained by TEM using the inTEM reagent during the 24h following difethialone administration. Concerning parameters obtained by TEM using the exTEM reagent only CFT increased significantly with a slope of 0.187 ($r^2=0.819$) after a lag time of 8 hours.

Fig 1

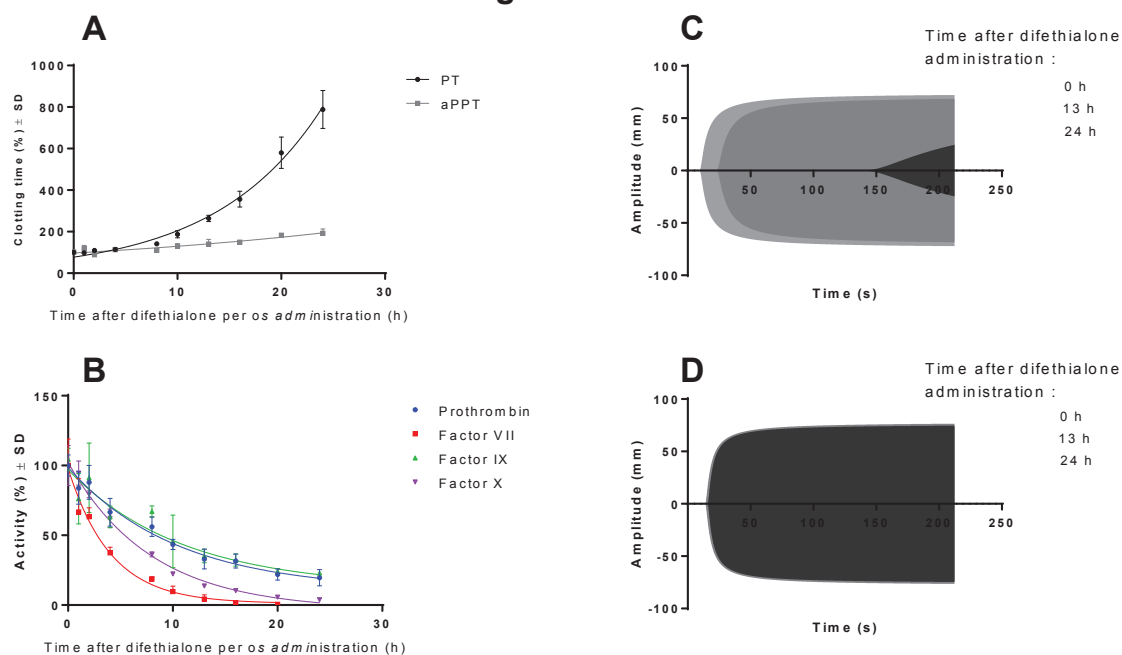


Figure 1. Results given by different coagulation monitoring methods after *per os* administration of 10 mg.kg⁻¹ of difethialone. (A). clotting time tests. Values are presented for each time as the relative mean of clotting time and their standard deviation; for each kind of test, the basal mean of clotting times is set at 100%. (B) Vitamin K dependent clotting factors' activities. Values are presented for each time as the relative mean of activities and their standard deviation; for each factor, the basal activities' mean is set at 100%. (C) Silhouettes of the thromboelastometry graph with exTEM reagents. (D) Silhouettes of the thromboelastometry graph with inTEM reagents.

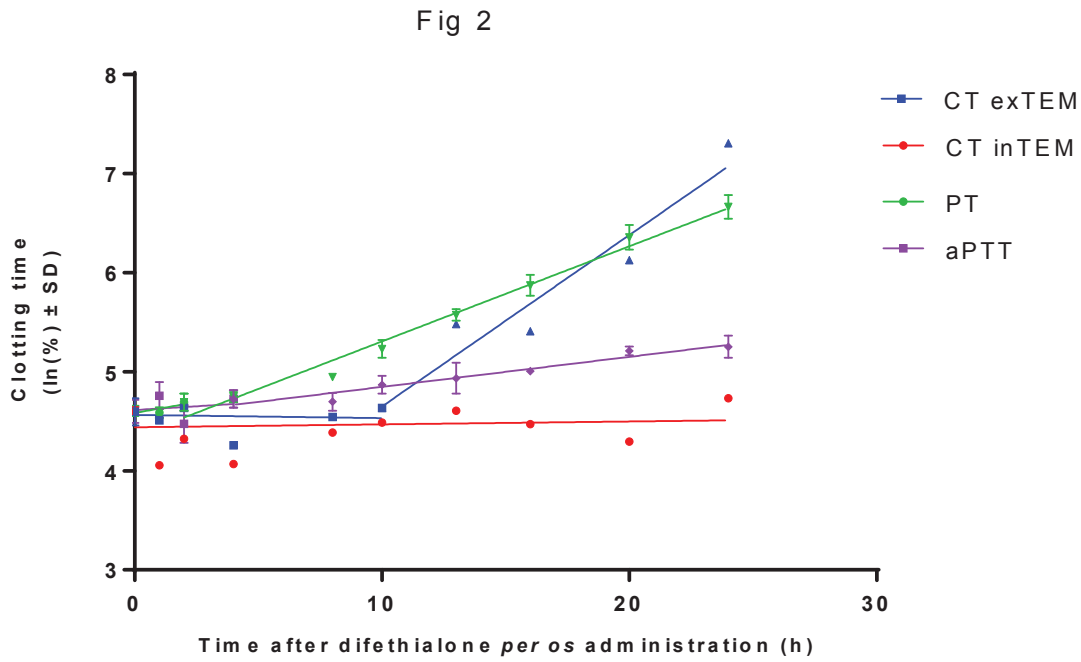


Figure 2. Evolution of different clotting times after *per os* administration of 10 mg.kg⁻¹ of difethialone. Values are represented as the linearization by a logarithmic function of relative mean for each time and their standard deviation; for each clotting time, the bclotting times' mean is set at 100%.

Fig 3

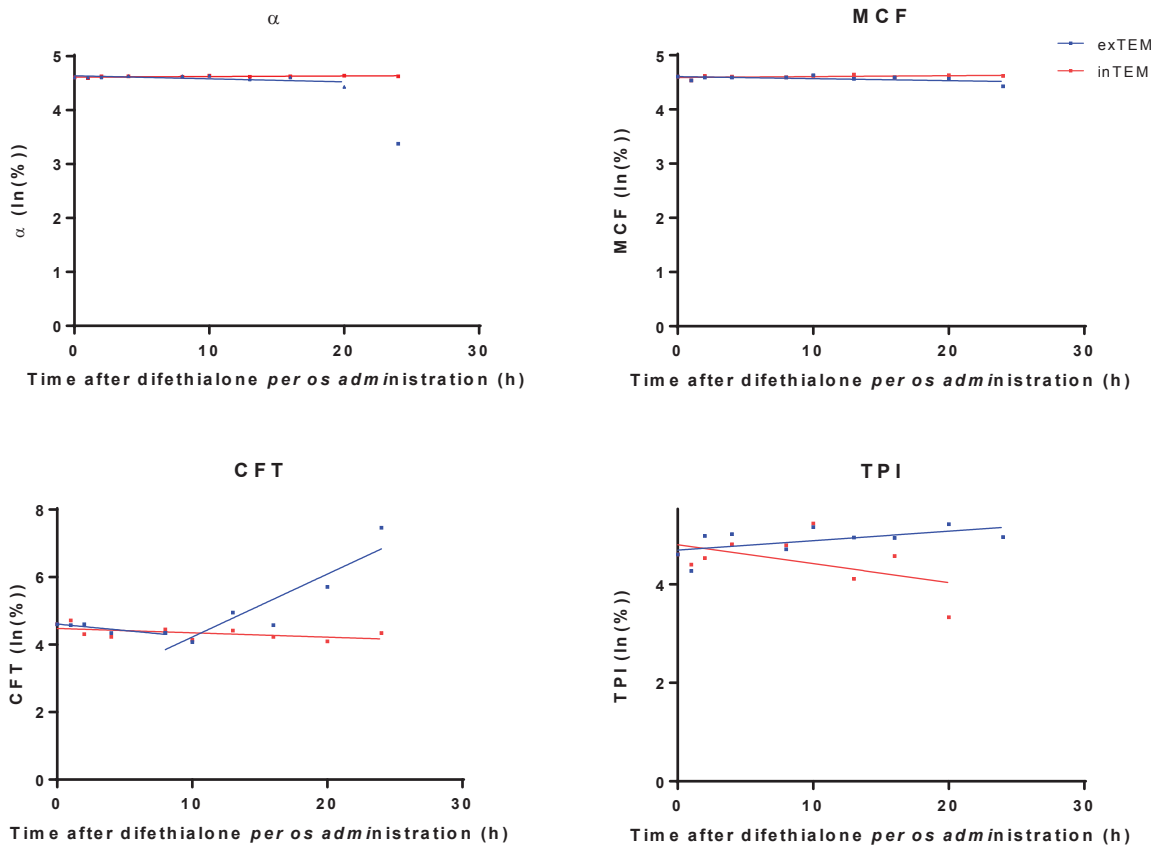


Figure 3. Evolution of different TEM parameters after *per os* administration of 10 mg.kg⁻¹ of difethialone. Values are represented as the linearization by a logarithmic function of relative mean for each time and their standard deviation; for each parameter, the basal parameter values' mean is set at 100%.

Table 1. Values of parameters from linear regressions performed on linearized data of each clotting parameter evolution after *per os* administration of difethialone. Values are presented with their 95% confidence interval.

Clotting parameters	Lag Time (h)	During the lag time		After the lag time		R Square	Doubling time
		Slope (h ⁻¹)	p-value	Slope (h ⁻¹)	p-value		
CT exTEM	10	-0.003 (-0.035 to 0.028)	20.819/*	0.173 (0.083 to 0.263)	0.0088	0.925	4.0 (2.6 to 8.4)
α exTEM	>20	-0.002 (-0.005 to 0.0002)	0.069	N/A	N/A	N/A	
MCF exTEM	>24	-0.002 (-0.004 to 0.0004)	0.098	N/A	N/A	N/A	
CFT exTEM	8	-0.038 (-0.079 to 0.003)	0.059	0.187 (0.065 to 0.308)	0.013	0.819	3.7 (2.3 to 10.7)
TPI exTEM	>24	0.008 (-0.001 to 0.018)	0.086	N/A	N/A	N/A	
CT inTEM	>24	0.003 (-0.013 to 0.018)	0.693	N/A	N/A	N/A	
α inTEM	>24	0.0004 (-0.00006 to 0.0009)	0.089	N/A	N/A	N/A	
MCF inTEM	>24	0.001 (-0.0003 to 0.002)	0.176	N/A	N/A	N/A	
CFT inTEM	>24	-0.005 (-0.013 to 0.001)	0.103	N/A	N/A	N/A	
TPI inTEM	>20	-0.017 (-0.042 to 0.008)	0.158	N/A	N/A	N/A	
Prothrombin time	2	0.044 (-0.022 to 0.111)	0.161	0.096 (0.089 to 0.103)	< 0.0001	0.972	7.2 (6.7 to 7.8)
aPTT	4	0.015 (-0.059 to 0.090)	0.661	0.030 (0.023 to 0.037)	< 0.0001	0.825	22.9 (18.7 to 30.1)

3.2 ASSESSMENT OF VKA-DEPENDENT HYPOCOAGULABILITY BY DIRECT MEASUREMENT OF VITAMIN K-DEPENDENT CLOTTING FACTORS ACTIVITY

Activities of vitamin K-dependent clotting factors II, VII, IX and X were measured during the first 24 hours after difethialone administration (Figure 1). To facilitate the analysis, for each clotting factor activity, results are expressed comparatively to the corresponding clotting factor activity before difethialone administration then linearized with the natural logarithm function (Figure 4). A lag time was pinpointed only for factor IX and X, of respectively 2 hours and 1 hour. Conversely, one hour after the difethialone administration, prothrombin and factor VII activities were already significantly decreased (respectively $P=0.048$ and $P=0.037$). Factor VII activity had the most important decrease with a slope of -0.26 h^{-1} ($r^2=0.978$), following by the factor X activity with a slope of -0.14 h^{-1} ($r^2=0.989$). Prothrombin and factor IX activity decreases were similar with a slope of respectively -0.07 h^{-1} ($r^2=0.937$) and -0.06 h^{-1} ($r^2=0.843$). Concerning the factor VII, its activity at 24h was under the limit of quantification. The lag time before a significant modification of the clotting factor activity and the slope of clotting factor activity evolution after this lag time are resumed in table 2.

Fig 4

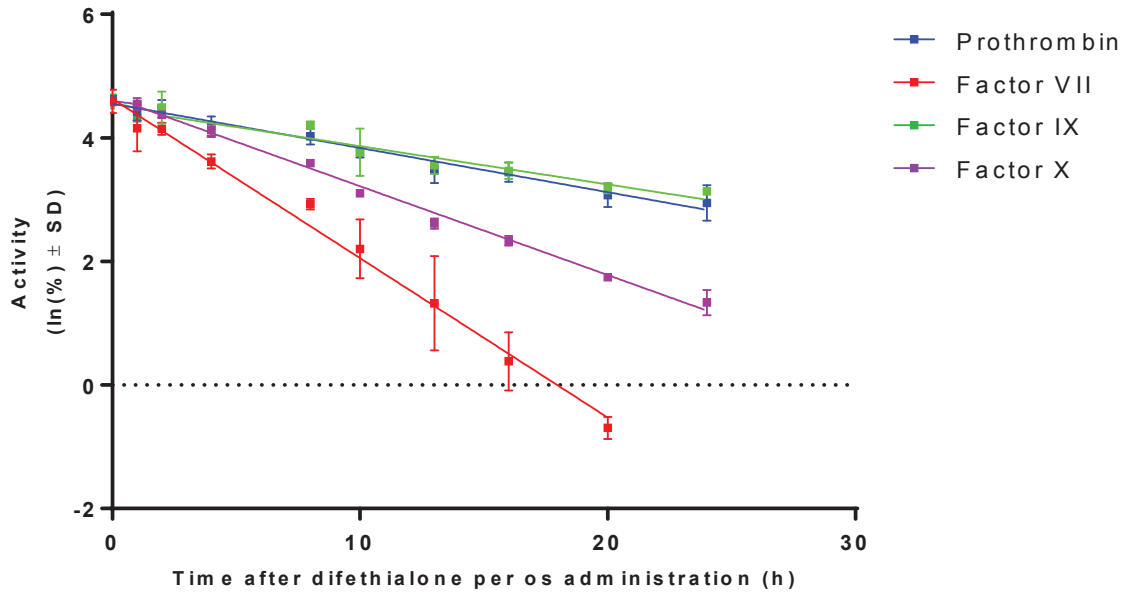


Figure 4. Evolution of different clotting factors activity after *per os* administration of 10 mg.kg⁻¹ of difethialone. Values are represented as the linearization by a logarithmic function of relative mean for each time and their standard deviation; for each factor, the basal factor activities' mean is set at 100%.

Table 2. Values of parameters from linear regressions performed on linearized data of each clotting factor evolution after *per os* administration of difethialone. Values are presented with their 95% confidence interval.

Clotting factor	Lag Time (h)	During the lag time		After the lag time		R Square	Half-life (h)
		Slope (h ⁻¹)	P-value	Slope (h ⁻¹)	p-value		
Prothrombin	0	NA	NA	-0.072 (-0.078 to -0.065)	<0.0001	0.937	9.7 (8.9 to 10.7)
Factor VII	0	NA	NA	-0.258 (-0.275 to -0.241)	<0.0001	0.972	2.7 (2.5 to 2.9)
Factor IX	2	-0.078 (-0.307 to 0.150)	0.441	-0.062 (-0.074 to -0.050)	<0.0001	0.843	11.0 (9.6 to 13.1)
Factor X	1	-0.049 (-0.274 to 0.177)	0.630	-0.144 (-0.150 to -0.137)	<0.0001	0.989	4.9 (4.7 to 5.1)

3.3 ASSESSMENT OF THE CORRELATION BETWEEN COAGULABILITY PARAMETERS AND CLOTTING FACTORS

In order to evaluate the correlation between coagulability parameters and clotting factors evolution we added data obtained from male rats which received a *per os* administration of 10 mg.kg⁻¹ of difethialone, then 48 hours after an administration of 10 mg.kg⁻¹ of vitamin K₁. Owing to the important lag time observed with TEM parameters and the evolution weakness of the aPTT the correlation was successfully performed only with PT. Clotting factors and PT were expressed comparatively to the corresponding basal level before any administration, then transformed by natural logarithm function. Each vitamin K-dependent clotting factors evolution are represented in function of the PT in Figure 5. For each factor, slope and origin obtained after the linear regression of data during the decrease of clotting were compared with those obtained after the vitamin K₁ administration. Only the evolution of factor IX against PT was significantly different regarding slopes between decrease and regeneration phases (P=0.009).

Concerning prothrombin and factor VII, slopes between both phases were not significantly different (respectively $P=0.150$ and $P=0.952$) but their origins were different (respectively $P<0.0001$ and $P=0.007$). Finally, the linear regression parameters for the factor X evolution did not differ significantly between both phases for slopes ($P=0.884$) or origins ($P=0.793$).

Fig 5

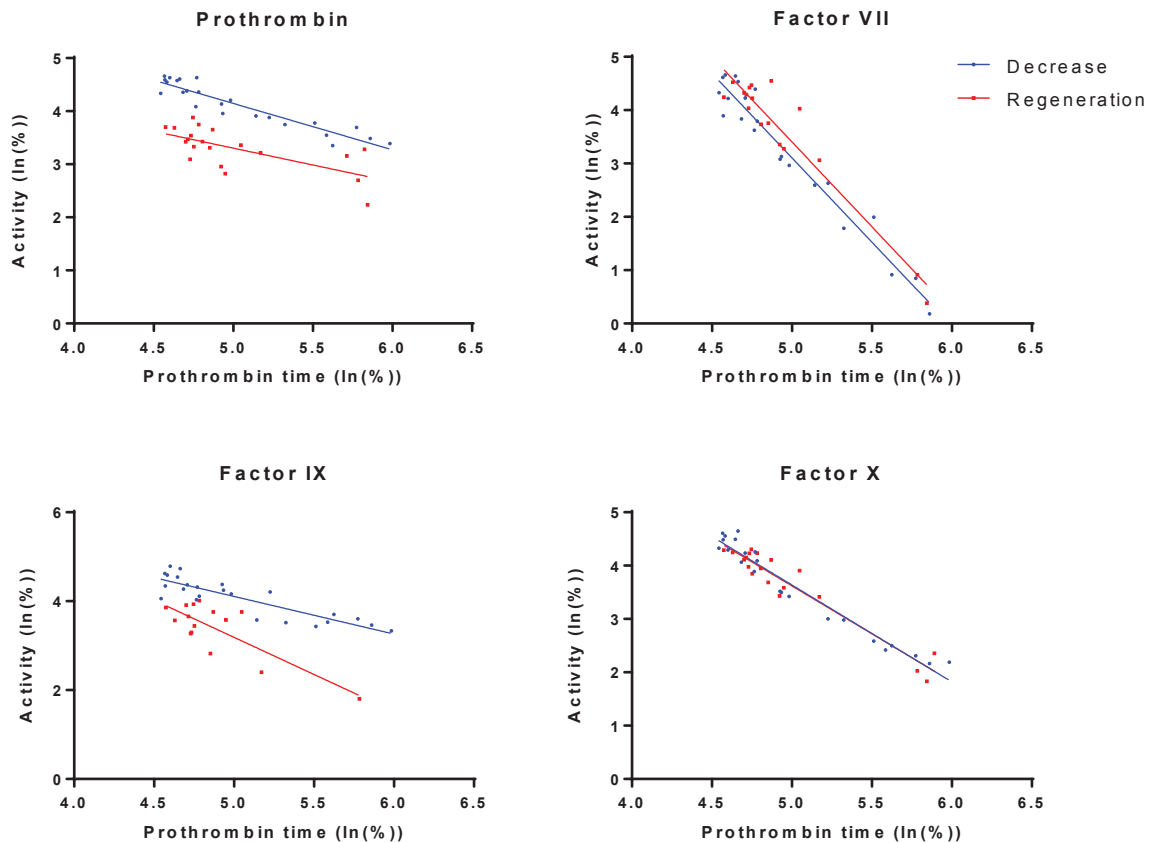


Figure 5. Evolution of clotting factors activity against prothrombin time during the decrease of coagulation capacity or its regeneration. Values are represented as the linearization by a logarithmic function of relative values for each couple factors-prothrombin time; the basal factor activities' mean and the basal clotting times' mean are set at 100%.

4 DISCUSSION

In human medicine the prothrombin time is the main parameter of VKA therapy monitoring, in the form of the International Normalized Ratio form (Horton and Bushwick 1999; Kuruvilla and Gurk-Turner 2001). The aim of this monitoring is to avoid VKA adverse event and to follow possible change in patient physiology (hepatic induction). The purpose of the monitoring of parameters in rodent research is to test VKA molecules or rodent resistance strains (Gill et al. 1993; Gill et al. 1994). They were standardized by the Rodenticide Resistance Action Committee in order to obtain a discriminating dose for each VKA (Rodenticide Resistance Action Committee 2003). Discriminating doses of anticoagulants, called ED50 (i.e., effective dose 50), were determined in rodents to characterize the susceptibility of rats to anticoagulants. ED50 corresponds to the dose leading to 50% of animals tested with a 5-fold increase of the International Normalized Ratio 24 hours after the administration of anticoagulants. International Normalized Ratio is calculated from PT. Consequently, in rodent VKA research, PT is also the key parameter too. Nevertheless, it might be relevant to follow other parameter in order to diminish the duration of the resistance test and the number of used animals used and to improve the reproducibility of the method. Indeed, many technics have been described to assess the blood coagulation in rat. Some of these technics explore the blood capacity to coagulate. The simplest technic as PT or aPTT give only a clotting time whereas the TEM using exTEM reagent – i.e. containing tissue factor - or inTEM reagent – i.e., containing ellagic acid or calcium - assess the global formation of the clot by providing many data. TEM is expect to become the future cornerstone in patient bleeding risk assessment (Giancarlo Maria Liumbruno 2012). It has been yet used in some transfusion protocol and in cardiac and liver surgery (Gorlinger et al. 2011; Bolt, Steenstrup, and Kristensen 2007) and recent studies try to increase its application scope (Schmidt et al. 2015). In rat, TEM is increasingly used to measure

coagulability in research (Nielsen et al. 2014; Kampfmann et al. 2012). Thus, it might help to refine ED50 test in rats by replacing INR. Finally, the last kind of methods explore the activity of the vitamin K dependent clotting factors themselves. All these tests were applied in this study in order to determinate the best method and the best parameter(s) to follow a VKA administration in rats and the possible correlation between clotting times and vitamin K dependent clotting factors.

To cause experimental anticoagulation in laboratory rats, we chose to administer difethialone orally. The oral administration corresponds to the normal route of administration of anticoagulant rodenticides in rodents. Difethialone is one of the most powerful anticoagulant molecules currently available. In addition, to be sure to have completely inhibit the vitamin K regeneration cycle, a dose 25 times higher than the ED50 was administered. The ED50 of difethialone for the male rats is of 0.4 mg.kg^{-1} , according to the technical monograph of 2003 (Rodenticide Resistance Action Committee 2003). After administering the anticoagulant, coagulation was assessed by the various methods mentioned above. A good parameter to study of VKA efficiency has to be reliable and to vary quickly with the shortest lag time. Figure 6 presents the half-lives and doubling times resulting of the evolution of different parameters during the first 24 hours after administration of difethialone. The current reference assay, the PT, presented in our study a lag time of two hours, then a doubling time of 9.7 h with a good accuracy (0.972). As expected, aPTT evolved slower than PT. Conversely, two parameters determined by TEM performed with exTEM reagent, CT and CFT, seemed to change faster, after the lag time, than other clotting formation assessment parameters, and peculiarly than PT. Nevertheless, both parameters obtained by TEM using the ExTEM reagent showed an important lag time before increasing; 10 hours for CT and 8 hours for the CFT. Moreover, doubling time of these parameters presented very wide confidence ranges. These large ranges were due, on one hand, to a lack of reliability of this method in these conditions, and on the

other hand, to the number of rat at each time used for the TEM method. Indeed, we respected the recommendations to perform thromboelastometry in rodents (Wohlauer et al. 2011). These recommendations impose time constrains in sample processing. Samples have to be ran within two hours following the sampling. Freezing the sample before the analysis is not possible, conversely to PT measurement where the sample can be stored at -70°C until one month without significant differences (Alesci, Borggreffe, and Dempfle 2009). In our case we had to adapt our protocol schedule and to restrict the measure to one specimen for each time for TEM methods. Another concern is about the quantity of blood needed which is of $300\mu\text{L}$ against $100\mu\text{L}$ of plasma for prothrombin time, making it difficult for its use in little rodent as mice, mainly if animal has to stay alive. Moreover, standardized method and reference values have not been defined for whole animals. Finally, the others parameters measured by TEM using exTEM reagent and all others parameters measured with inTEM reagent did not show significant evolution during the 24 hours following difethialone administration. Consequently, concerning technics which assess the blood capacity to coagulate and considering their lag time, their importance of evolution, their reliability and their simplicity of implementation in research schedule, PT is the best method to assess the effectiveness of VKA during the first 24 hours. This conclusion is in line with a previous study in human treated with warfarin (Dunham et al. 2014).

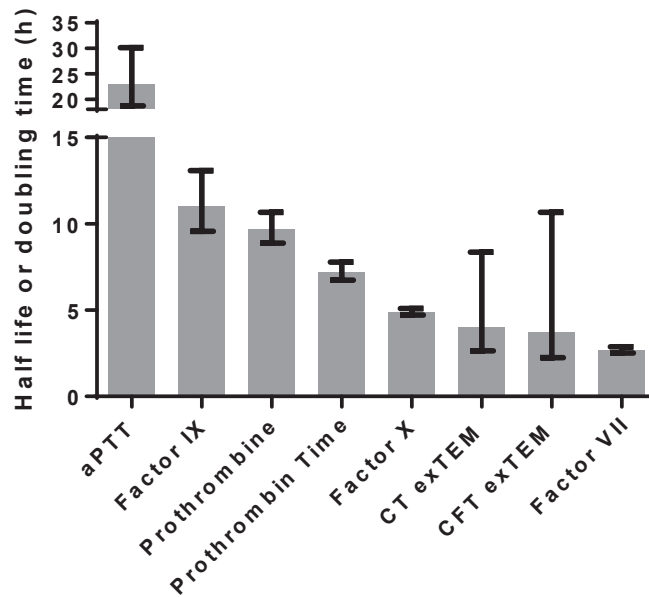


Figure 6. Values half-life or doubling time of each parameter evolution after *per os* administration of difethialone. Values are presented with their 95% confidence interval. Parameters with no significant evolution are not represented.

Contrary to the parameters determined by the global coagulation tests, almost no lag time was observed for the evolution of clotting factors activities. Lag times for factor IX and X were very limited, respectively of 2 and 1 hour(s) and factors II and VII activities evolved immediately after VKA administration. Moreover, two of them, factors VII and X, evolved faster than the gold standard prothrombin time. Consequently, factors VII and X can be interesting to study the kinetic and the efficiency of VKA in rodents, especially since they seem to be the subject of few interindividual variations. The great advantage of factor VII is its short half-life which may be useful to study the effect of VKA few hours after its administration. But 24 hours after the VKA administration, no more activity is detected for factor VII. Therefore 24h after VKA administration, factor X measurement should be preferred to monitor VKA efficiency. In addition to these benefits, clotting factors activities seem to be stable over storage time (Awad,

Selim, and Al-Sabbagh 2004). Moreover, the quantification of vitamin K dependent clotting factor activities is fairly simple in rats. Indeed, only gamma-carboxylated vitamin K dependent clotting factors are released in the blood of rats. However in other species of rodents such as mice, both factors, gamma- and non-gamma-carboxylated, are released. It could be an issue for prothrombin quantification. Indeed, chromogenic assay with ecarin doses both forms of prothrombin. In order to quantify only active prothrombin, it would be necessary to purify prothrombin or to use a quantification by a prothrombin time based assay (the test plasma is completed by deficient II plasma) as used in human medicine (Baumann Kreuziger et al. 2014). Nevertheless this method has not been assessed for rodent use.

In order to use the measurement of vitamin K dependent clotting factors activity to monitor the VKA action instead of prothrombin time, it is essential to study the correlation between these parameters. In human medicine many studies have been performed to assess the importance of each clotting factor on prothrombin time by using dilution of clotting factors (Plum 1943). Moreover, many *in vitro* studies have been performed to characterize each reaction from the human coagulation cascade, which allows to model mathematically the cascade and to assess the importance of each factor (Shavlyugin, Hanin, and Khanin 2014; Khanin, Rakov, and Kogan 1998). However, concerning the rat, there is too little information on cascade to create such model. But the study of the evolution of clotting factors relatively to prothrombin time might help to identify which clotting factor determine prothrombin time during VKA intoxication because it is the restraining element. The difficulty of this analysis is that all vitamin K dependent decrease and so it is not possible to individualize the action of one. We hypothesized that if one vitamin K dependent clotting factor lead to the variation in the decrease of the clotting capacity, it might also lead to it in the restauration of this capacity. Thus for this clotting factor the curve obtained when clotting capacity decreased and that one obtained during the regeneration of clotting capacity might be the same. In our experiment, only the factor X

20

fulfilled this requirement. This result is consistent with the hypothesis of Kerins and MacNicoll (Kerins and MacNicoll 1999). that the factor X has greater effect on the prothrombin time of rats than others, whereas, in human, the dilution assays and the mathematic model results give prothrombin as the critical factor for the prothrombin time (Talstad 1993; Khanin, Rakov, and Kogan 1998). This relation between prothrombin time and factor X might be useful in order to refine ED50 test. Indeed, the activity of the factor X enables to monitor more efficiently a VKA-dependent anticoagulation in rodents than PT, while being totally correlated with the evolution of PT. The use of factor X activity measurement could thus diminish the duration of ED50 tests and improve the monitoring of VKA action in rodent research.

5 CONCLUSION

During the 24 hours following administration of an antivitamin K anticoagulant, Prothrombin time assay seems to be a better method than thromboelastometry to monitor coagulation in rodents. Nevertheless, measuring the activities of vitamin K-dependent clotting factors would enable to detect an anticoagulation status earlier. Table 3 summarizes the applicability of each technic to monitor VKA-anticoagulation in rodents and their benefits. Factor X is the critical factor which determine the prothrombin time in rats under antivitamin K anticoagulant and enables to follow most effectively the anticoagulation status. Further studies should be performed to confirm the relevance of this factor to follow the anticoagulation in the different strains of resistant rats.

Table 3. Summary of the upside and downside of each technic to monitor a VKA-dependent anticoagulation in rodents. Three characteristics, Precocity, reliability and Amplitude of evolution are respectively assessed according to lag time, R-square and half-life or doubling time.

	Assay	Parameter	Applicability	Precocity	Reliability	Amplitude of evolution	
Global coagulation assays	PT-Quick	Clotting time	A	+	++	+	
	APTT	Clotting time	Q	+	-	-	
	TEG/TEM-TF (ExTEM)	Clotting time	A	-	+	++	
		α	N				
		MCF	N				
		CFT	Q	-	-	++	
		TPI	N				
	TEG/TEM-CA (InTEM)	Clotting time	N				
		α	N				
		MCF	N				
		CFT	N				
		TPI	N				
	Specialty assays	Clotting factor activity	Factor II	A	+++	+	+
			Factor VII	A	+++	++	+++
Factor IX			A	+	-	+	
Factor X			A	++	+++	++	

A, applicable, Q, questionable, N, not applicable

7 REFERENCES

- Alesci, Sonja, Martin Borggrefe, and Carl-Erik Dempfle. 2009. "Effect of Freezing Method and Storage at -20°C and -70°C on Prothrombin Time, aPTT and Plasma Fibrinogen Levels." *Thrombosis Research* 124 (1): 121–26. doi:10.1016/j.thromres.2008.11.010.
- Awad, Mohammed A, Tarek E Selim, and Fatma A Al-Sabbagh. 2004. "Influence of Storage Time and Temperature on International Normalized Ratio (INR) Levels and Plasma Activities of Vitamin K Dependent Clotting Factors." *Hematology* 9 (5-6): 333–37. doi:10.1080/10245330400010646.
- Baumann Kreuziger, Lisa M, Yvonne H Datta, Andrew D Johnson, Nicole D Zantek, Ryan Shanley, and Mark T Reding. 2014. "Monitoring Anticoagulation in Patients with an Unreliable Prothrombin Time/international Normalized Ratio: Factor II versus Chromogenic Factor X Testing." *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 25 (3). NIH Public Access: 232–36. doi:10.1097/MBC.0000000000000030.
- Bolt, Gert, Thomas D. Steenstrup, and Claus Kristensen. 2007. "All Post-Translational Modifications except Propeptide Cleavage Are Required for Optimal Secretion of Coagulation Factor VII." *Thrombosis and Haemostasis*, October. doi:10.1160/TH07-05-0332.
- Boyle, C. Mary. 1960. "Case of Apparent Resistance of *Rattus Norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons." *Nature* 188 (4749): 517–517. doi:10.1038/188517a0.
- Buckle, Alan P, and Robert H Smith. 2015. *Rodent Pests and Their Control, 2nd Edition*. CABI.
- Dunham, C, Charlene Rabel, Barbara M Hileman, Jason Schiraldi, Elisha A Chance, Mark T Shima, Aldo A Molinar, and David A Hoffman. 2014. "TEG® and RapidTEG® Are

- Unreliable for Detecting Warfarin-Coagulopathy: A Prospective Cohort Study.” *Thrombosis Journal* 12 (1): 4. doi:10.1186/1477-9560-12-4.
- Giancarlo Maria Liumbruno, for the Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology (SIMTI) Working Party. 2012. “Thromboelastography and Thromboelastometry and the Management of Intra-Operative Transfusion Therapy in Massively Bleeding Patients.” *Blood Transfusion* 10 (3). SIMTI Servizi: 400. doi:10.2450/2012.0130-11.
- Gill, J. Erica, Gerard M. Kerins, Stephen D. Langton, and Alan D. Macnicoll. 1993. “The Development of a Blood Clotting Response Test for Discriminating between Difenacoum-Resistant and Susceptible Norway Rats (*Rattus Norvegicus*, Berk.).” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 104 (1): 29–36. doi:10.1016/0742-8413(93)90106-U.
- Gill, J. Erica, Gerard M. Kerins, Stephen D. Langton, and Alan D. MacNicoll. 1994. “Blood-Clotting Response Test for Bromadiolone Resistance in Norway Rats.” *The Journal of Wildlife Management* 58 (3): 454–61. doi:10.2307/3809316.
- Gorlinger, K, D Dirkmann, A A Hanke, M Kamler, E Kottenberg, M Thielmann, H Jakob, and J Peters. 2011. “First-Line Therapy with Coagulation Factor Concentrates Combined with Point-of-Care Coagulation Testing Is Associated with Decreased Allogeneic Blood Transfusion in Cardiovascular Surgery: A Retrospective, Single-Center Cohort Study.” *Anesthesiology* 115 (6).
- Greaves, J. 1970. “Warfarin-Resistant Rats.” *Royal Society of Health Journal* 90 (6): 289. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5531174>.
- Greaves, J. H. 1971. “Resistance to Anticoagulants in Rodents.” *Pesticide Science* 2 (6): 276–79. doi:10.1002/ps.2780020609.

- Harauchi, Toshio, Kyoji Takano, Minoru Matsuura, and Toshio Yoshizaki. 1986. "Liver and Plasma Levels of Descarboxyprothrombin (PIVKA II) in Vitamin K Deficiency in Rats." *The Japanese Journal of Pharmacology* 40 (4): 491–99. doi:10.1254/jjp.40.491.
- Horton, Jon D., and Bruce M. Bushwick. 1999. "Warfarin Therapy: Evolving Strategies in Anticoagulation." *American Family Physician* 59 (3): 635–46.
- Ishizuka, Mayumi, Fumie Okajima, Tsutomu Tanikawa, Heewon Min, Kazuyuki D. Tanaka, Kentaro Q. Sakamoto, and Shoichi Fujita. 2007. "Elevated Warfarin Metabolism in Warfarin-Resistant Roof Rats (*Rattus Rattus*) in Tokyo." *Drug Metabolism and Disposition* 35 (1): 62–66. doi:10.1124/dmd.106.011775.
- Jackson, C. M., and M. Peter Esnouf. 2005. "Has the Time Arrived to Replace the Quick Prothrombin Time Test for Monitoring Oral Anticoagulant Therapy?" *Clinical Chemistry* 51 (3). American Association for Clinical Chemistry: 483–85. doi:10.1373/clinchem.2004.045393.
- Kampfmann, Iris, Natali Bauer, Sigrid Johannes, and Andreas Moritz. 2012. "Differences in Hematologic Variables in Rats of the Same Strain but Different Origin." *Veterinary Clinical Pathology* 41 (2): 228–34. doi:10.1111/j.1939-165X.2012.00427.x.
- Kerins, Gerard M, and Alan D MacNicoll. 1999. "Comparison of the Half-Lives and Regeneration Rates of Blood Clotting Factors II, VII, and X in Anticoagulant-Resistant and Susceptible Norway Rats (*Rattus Norvegicus* Berk.)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122 (3): 307–16. doi:10.1016/S0742-8413(98)10128-7.
- Khanin, Mikhail A, Dmitrii V Rakov, and Alexander E Kogan. 1998. "Mathematical Model for the Blood Coagulation Prothrombin Time Test." *Thrombosis Research* 89 (5): 227–32. doi:10.1016/S0049-3848(97)00288-0.

- Kuruvilla, Mariamma, and Cheryle Gurk-Turner. 2001. "A Review of Warfarin Dosing and Monitoring." *Proceedings (Baylor University. Medical Center)* 14 (3): 305–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1305837/>.
- Lasseur, Romain, Christiane Longin-Sauvageon, Bernadette Videmann, Mikaëline Billeret, Philippe Berny, and Etienne Benoit. 2006. "Warfarin Resistance in a French Strain of Rats." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 19 (6): 379–85. doi:10.1002/jbt.20104.
- MacNicoll, Alan D, and J. Erica Gill. 1993. "Revised Methodology for a Blood-Clotting Response Test for Identification of Warfarin-Resistant Norway Rats (*Rattus Norvegicus*)." *EPPO Bulletin* 23 (4): 701–7. doi:10.1111/j.1365-2338.1993.tb00571.x.
- Markussen, Mette DK, Ann-Charlotte Heiberg, Merete Fredholm, and Michael Kristensen. 2008. "Differential Expression of Cytochrome P450 Genes between Bromadiolone-Resistant and Anticoagulant-Susceptible Norway Rats: A Possible Role for Pharmacokinetics in Bromadiolone Resistance." *Pest Management Science* 64 (3): 239–48. doi:10.1002/ps.1506.
- Nielsen, L. N., B. Wiinberg, M. Häger, H. L. Holmberg, J. J. Hansen, K. Roepstorff, and M. Tranholm. 2014. "A Novel *F8*^{-/-} Rat as a Translational Model of Human Hemophilia A." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12 (8): 1274–82. doi:10.1111/jth.12635.
- Plum, P. 1943. "Relation between Prothrombin Concentration and Clotting Time¹." *Acta Medica Scandinavica* 115 (1-2): 41–56. doi:10.1111/j.0954-6820.1943.tb15042.x.
- Rodenticide Resistance Action Committee. 2003. A Reappraisal of Blood Clotting Response Tests for Anticoagulant Resistance and a Proposal for a Standardised BCR Test Methodology. CropLife international.
- Rost, Simone, Hans-Joachim Pelz, Sandra Menzel, Alan D. MacNicoll, Vanina León, Ki-Joon Song, Thomas Jäkel, Johannes Oldenburg, and Clemens R. Müller. 2009. "Novel Mutations

in the VKORC1 Gene of Wild Rats and Mice – a Response to 50 Years of Selection Pressure by Warfarin?” *BMC Genetics* 10 (February): 4. doi:10.1186/1471-2156-10-4.

Schmidt, David E., Margareta Holmström, Ammar Majeed, Doris Näslin, Håkan Wallén, and Anna Ågren. 2015. “Detection of Elevated INR by Thromboelastometry and Thromboelastography in Warfarin Treated Patients and Healthy Controls.” *Thrombosis Research* 135 (5): 1007–11. doi:10.1016/j.thromres.2015.02.022.

Segal, Jodi B., and Walter H. Dzik. 2005. “Paucity of Studies to Support That Abnormal Coagulation Test Results Predict Bleeding in the Setting of Invasive Procedures: An Evidence-Based Review.” *Transfusion* 45 (9). Blackwell Science Inc: 1413–25. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.00546.x.

Shavlyugin, Evgeny A., Leonid G. Hanin, and Mikhail A. Khanin. 2014. “Dynamics of Pathologic Clot Formation: A Mathematical Model.” *Journal of Theoretical Biology* 340 (January): 96–104. doi:10.1016/j.jtbi.2013.08.007.

Sølbeck, Sacha, Sisse R Ostrowski, and Pär I Johansson. 2012. “A Review of the Clinical Utility of INR to Monitor and Guide Administration of Prothrombin Complex Concentrate to Orally Anticoagulated Patients.” *Thrombosis Journal* 10 (1). BioMed Central: 5. doi:10.1186/1477-9560-10-5.

Spahn, Donat R, Bertil Bouillon, Vladimir Cerny, Timothy J Coats, Jacques Duranteau, Enrique Fernández-Mondéjar, Daniela Filipescu, et al. 2013. “Management of Bleeding and Coagulopathy Following Major Trauma: An Updated European Guideline.” *Critical Care (London, England)* 17 (2). BioMed Central: R76. doi:10.1186/cc12685.

Stenflo, Johan, Per Fernlund, William Egan, and Peter Roepstorff. 1974. “Vitamin K Dependent Modifications of Glutamic Acid Residues in Prothrombin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (7): 2730–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC388542/>.

Talstad, I. 1993. "Which Coagulation Factors Interfere with the One-Stage Prothrombin Time?"

Haemostasis 23 (1): 19–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8477905>.

Wohlauer, Max V., Ernest E. Moore, Jeffrey Harr, Eduardo Gonzalez, Miguel Fragoso, and

Christopher C. Silliman. 2011. "A Standardized Technique for Performing

Thrombelastography in Rodents." *Shock (Augusta, Ga.)* 36 (5): 524–26.

doi:10.1097/SHK.0b013e31822dc518.

III.3.2 Article 3 (en cours de rédaction): Test de génération de thrombine un outil fiable dans l'évaluation de la pharmacodynamie des anticoagulants rodenticides chez les rongeurs

Titre anglais : Thrombin generation test: a reliable tool to evaluate anticoagulant rodenticide pharmacodynamics in rodents

III.3.2.1 Objectif

En complément des techniques décrites dans le précédent article, nous avons aussi évalué l'opportunité d'utiliser le test de génération de thrombine pour suivre l'action des AVK. Ce test à l'avantage de pouvoir suivre les différentes phases de la coagulation et pourrait ainsi fournir plus d'information qu'un simple temps de Quick. L'objectif de cet article est de développer le test de génération de thrombine dans le cadre d'une intoxication aux AVK.

III.3.2.2 Protocole

Dans un second temps, l'impact d'un AVK, la diféthialone, est évalué *in vivo* sur des rats mâles et femelles Sprague-Dawley. Après une période de 48h avec une alimentation carencée en vitamine K, une administration de 10 mg/kg de diféthialone *per os* est réalisée sur 39 rats mâles et 39 rats femelles. Ensuite, 0, 1, 2, 4, 8, 10, 13, 16, 20, 24, 32, 48 et 72 heures après l'administration de diféthialone, un groupe de trois mâles et trois femelles est mis à mort dans le but d'étudier l'évolution des paramètres du test de génération de thrombine. En plus de ces rats, dix autres rats mâles sont mis à mort dans le but de créer un pool de plasma ayant une coagulation non modifiée.

III.3.2.3 Principaux résultats

Cette expérience a mis en évidence une difficulté dans l'utilisation du test de génération de thrombine. En effet au bout de quelques heures après l'administration de diféthialone, la thrombine n'est plus générée au cours du test, ce qui empêche d'utiliser le protocole standard pour suivre l'action de l'AVK (Figure 15). Cependant, si le plasma testé est supplémenté avec le pool de plasma de rats non traités, il est alors possible de suivre la pharmacodynamie de l'AVK de façon fiable à l'aide de la hauteur du pic (PH) et du potentiel endogène de thrombine (ETP) (Figure 16). Néanmoins, après cette dilution deux paramètres issus de du test ne sont plus exploitables : le temps de latence et le temps au pic

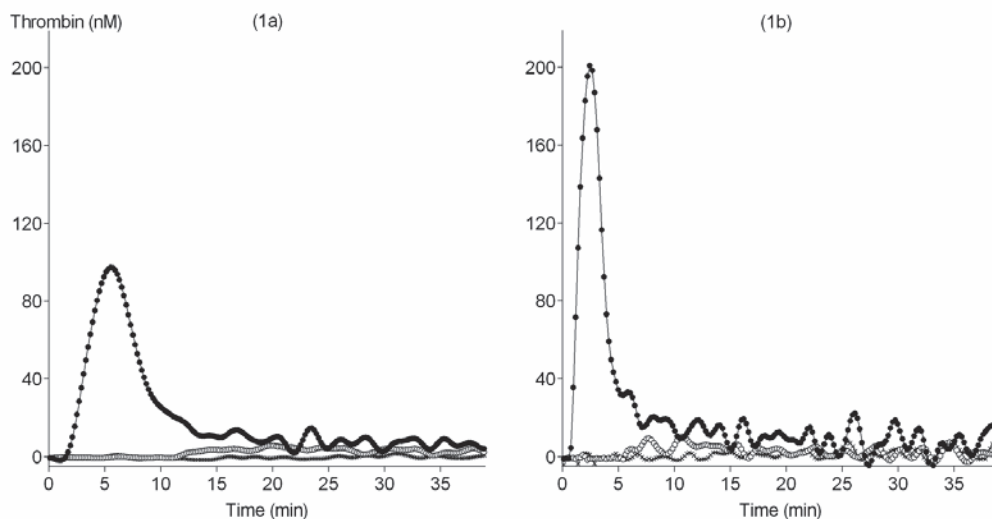


Figure 15 : test de génération de thrombine avec un protocole standard. TGT est effectué en ajoutant au plasma pauvre en plaquettes (PPP) des rats testés un réactif contenant soit 5 pM de facteur tissulaire et 4 μ M de phospholipides (a) soit 20 pM de facteur tissulaire et 4 μ M de phospholipides (b). Ronds noirs : PPP de rats non traités ; ronds vides : PPP de rats 24 h après l'administration de diféthialone ; croix : PPP de rats 72 h après l'administration de diféthialone.

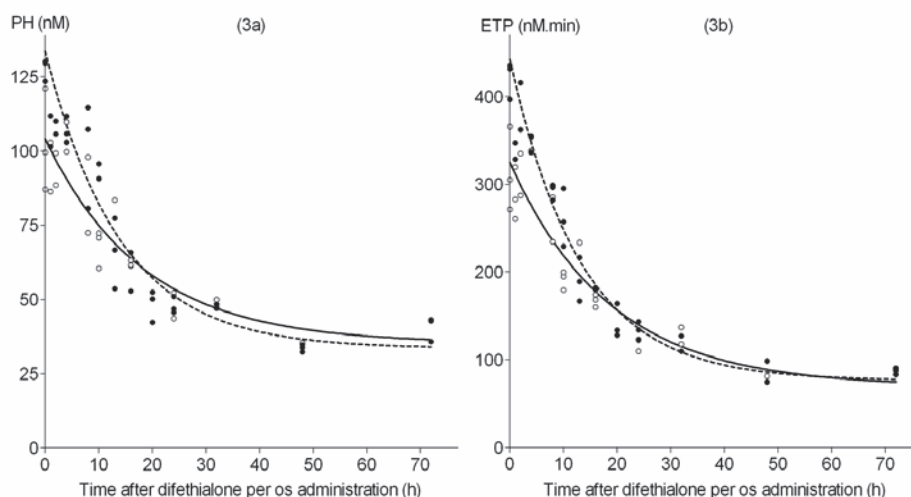


Figure 16 : Cinétique de la hauteur du pic (PH) et du potentiel endogène de thrombine (ETP) obtenue par le test de génération de thrombine après une administration per os de diféthialone. Le TGT est effectué avec du PPP de rats auxquels 10 mg/kg de diféthialone a été administrée. Les PPP sont dilués au 7.5/10 avec un pool de plasma de rats non traités. La réaction est initiée avec 5 pM de facteur tissulaire. Les ronds noirs représentent les valeurs des rats femelles et les ronds blancs celles des mâles.

III.3.3 Article 4 : De l'origine des différences de résistance naturelle aux anti-vitamine K liées au genre chez le rat

Titre anglais : Origin of the gender differences of the natural resistance to antivitamin K anticoagulants in rats

III.3.3.1 Objectif

Depuis la mise en évidence d'une résistance naturelle des rats femelles aux AVK, de nombreuses publications ont tenté d'expliquer, plus ou moins directement, cette différence [81, 90, 111]. Ainsi, il existe actuellement de nombreuses hypothèses sur l'origine de la différence de sensibilité. Elles sont regroupables en quatre grandes catégories d'origine : une résistance au niveau du cycle de la vitamine K ; une meilleure élimination des AVK ; une concentration basale des facteurs de la coagulation plus élevée chez les rats femelles ; une demi-vie des facteurs de la coagulation est plus longue chez les femelles. L'objectif de cette étude est d'explorer les différentes hypothèses sur l'origine de la plus faible sensibilité aux anticoagulants anti-vitamines K des rats femelles.

III.3.3.2 Protocole

Cette étude est constituée de deux parties, dans un premier temps le cycle de régénération de la vitamine K est étudié *in vitro*. Des foies sont prélevés sur des rats Sprague-Dawley mâles et femelles. Les microsomes de foies (contenant l'enzyme VKORC1) sont extraits par centrifugations différentielles des foies. La capacité des microsomes à transformer la vitamine K époxyde en vitamine K quinone est alors évaluée pour les mâles et les femelles. De même, l'incidence des AVK sur cette capacité est aussi mesurée.

Dans un second temps, l'impact d'un AVK, la diféthialone, est évalué *in vivo* sur des rats mâles et femelles Sprague-Dawley. Un premier groupe de 8 rats mâles et de 8 rats femelles est mis à mort 48 heures après le début de l'alimentation carencée dans le but d'explorer le niveau basal des paramètres de la coagulation sanguine. Après une même période d'alimentation carencée, une administration de 10 mg/kg de diféthialone *per os* est réalisée sur les autres rats. Ensuite, 1, 2, 4, 8, 10, 13, 16, 20, 24, 32, 48 et 72 heures après l'administration de diféthialone, un groupe de trois mâles et trois femelles est mis à mort dans le but d'étudier l'évolution des paramètres de la coagulation sanguine. Seront plus

particulièrement étudiés les quatre facteurs de la coagulation et le temps de Quick, qui est, d'après notre étude précédente, un bon paramètre pour suivre la coagulation vitamine K dépendante.

III.3.3.3 Principaux résultats

L'étude des propriétés enzymatiques des microsomes de foies n'a pas montré de différence significative pouvant expliquer la moins forte sensibilité des rats femelles aux AVK. Concernant l'étude de la coagulation basale, il a été mis en évidence que deux facteurs de la coagulation vitamine K dépendants (facteur VII et X) avaient une activité plus importante chez les rats femelles par rapport aux mâles. En accord avec ce résultat, le temps de Quick des rats femelles est plus faible que celui des rats mâles. De plus, la demi-vie de deux facteurs (facteur II et VII) est significativement plus longue pour les femelles et, pour le facteur VII, un plateau est observé durant 4 heures chez les femelles avant le début de sa décroissance, ce plateau est absent chez les mâles. Les résultats du temps de Quick confirment la plus grande résistance des femelles. Enfin, l'article montre que, comme pour la warfarine, pour une même dose administrée la concentration hépatique de difethialone est significativement plus élevée chez les femelles. Ces résultats sont l'objet de l'article ci-après.



Origin of the gender differences of the natural resistance to antivitamin K anticoagulants in rats



Sébastien Lefebvre, Benoit Rannou, Stéphane Besse, Etienne Benoit, Virginie Lattard*

USC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 January 2016

Received in revised form 4 February 2016

Accepted 5 February 2016

Available online 6 February 2016

Keywords:

Difethialone
Vitamin K antagonist
Susceptibility
Gender differences
Rat

ABSTRACT

Vitamin K antagonists (VKA) are used either in human medicine to prevent thromboembolic disorders or as rodenticides for pest control management. In rodents, female rats are described to be more tolerant to the action of vitamin K antagonists than males. Nevertheless, the mechanism of this greatest tolerance is still unknown and this study aims to identify the origin of this greatest tolerance after VKA administration. Therefore, difethialone, one of the most powerful VKA was used in this study.

A possible difference in the pharmacokinetics of difethialone between males and females was first investigated. The determination of the pharmacokinetic parameters allowed to exclude a pharmacokinetic origin of the greatest tolerance of females to VKA. Thus, a natural resistance to difethialone of the liver VKOR activity, which is the target of VKA, was thus explored in females. The determination of Ki towards difethialone in liver microsomes allowed to also exclude this hypothesis. Therefore, equipment in vitamin K-dependent clotting factors and properties of vitamin K-dependent clotting factors were explored. Basal activity of clotting factors VII and X were found significantly higher in females of respectively 43% and 21%. Moreover, after VKA administration, half-lives of clotting factors II and X were found significantly longer in females of respectively 27% and 10% and a lag time of 4 h before the beginning of the decay of factor VII was observed only in females after difethialone administration. The greater tolerance of female rats to VKA is thus due a stronger basal pool of vitamin K-dependent clotting factors VII and X and to a slower decline of vitamin K-dependent clotting factors II, VII and X after VKA administration.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In human medicine, vitamin K antagonists (VKA), derivatives of either 4-hydroxycoumarin or indane-1,3-dione, are widely prescribed in the prevention and the treatment of thromboembolic disorders. Warfarin, a derivative of 4-hydroxycoumarin, is the most used VKA worldwide and is prescribed to 2 million new patients in the USA each year. VKA are also used as rodenticides for pest control management. VKA exert their anticoagulant activity by stopping the recycling of vitamin K, which is the cofactor of oxydo-reduction reactions, including the activation of vitamin-K dependent clotting factors. The activation of vitamin-K dependent clotting factors is performed by the gamma-glutamyl carboxylase (GGCX). In the endoplasmic reticulum, GGCX converts glutamate (Glu) of vitamin K-dependent proteins in carboxylated glutamate

(Gla) (Furie et al., 1999). For each conversion, vitamin K hydroquinone has to be converted in vitamin K epoxide. Since the vitamin K dietary intake is not sufficient for the physiological needs (Ferland, 2012), vitamin K epoxide needs to be recycle in vitamin K hydroquinone by a vitamin K 2,3-epoxide reductase (VKOR) activity which involves mainly a vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) protein (Oldenburg et al., 2006). It is this enzyme which is the target of VKA.

Clotting factors II (i.e., Prothrombin), VII, IX and X are vitamin K-dependent proteins involved in the coagulation. These clotting factors need to be gamma-carboxylated to be able to chelate calcium and have a biological activity (Bandyopadhyay, 2008). The uncarboxylated vitamin K-dependent clotting factors circulate in very low level in rat blood (Harauchi et al., 1986). Clotting factor VII is involved in the extrinsic pathway, clotting factor IX in the intrinsic pathway, prothrombin and factor X are involved in the common pathway. Consequently, active vitamin K-dependent clotting factors are necessary for coagulation. By inhibiting VKORC1 protein (Rost et al., 2004; Li et al., 2004), VKA block the

Abbreviations: Gla, carboxylated glutamate; Glu, glutamate; GGCX, gamma-glutamyl carboxylase; VKA, vitamin K antagonists.

* Corresponding author. Fax: +33 0 478870516.

E-mail address: virginie.lattard@vetagro-sup.fr (V. Lattard).

gamma-carboxylation of vitamin K-dependent clotting factors, impairing the coagulation function.

VKA are difficult to use because of a narrow therapeutic index and a wide variability of dosage necessary to achieve stable anticoagulation. This variability is partly due to basic physiological parameters such as age, body weight, but also to co-occurring disorders, drug and food interactions. Sex-differences in the response to VKA could exist. If these differences are difficult to demonstrate in human medicine, such differences have been demonstrated in rats (Gill et al., 1994; Kerins and MacNicoll, 1999). Female rats are more tolerant to VKA than males. The underlying mechanism of this resistance is still unknown. Differences of VKOR activity could be associated with the natural resistance of females. Indeed, mutations of VKORC1 enzyme can lead to resistance to VKA (Rost et al., 2004; Watzka et al., 2011; Hodroge et al., 2012; Pelz et al., 2005, 2012). If this VKORC1 mutation-induced mechanism can be excluded in the case of the natural resistance to VKA of females, differences in the expression level of genes encoding putative partner proteins of VKORC1, such as calumenin (Wallin et al., 2001), epoxide hydrolase (Guenther et al., 1998) or glutathione transferase (Cain et al., 1998), could modify this VKOR activity. Other mechanisms could be suspected to explain the better tolerance of females to VKA, such as the existence of metabolic differences between males and females (Huber et al., 1999; Markussen et al., 2007, 2008; Mugford and Kedderis, 1998; Waxman, 1988), or even a natural resistance of the coagulation cascade (Lemini et al., 2007) after VKA administration.

The aim of this study is to demonstrate first the greater tolerance of the female rats to VKA compared to males and to characterize this tolerance, and thus to identify the underlying mechanism of this greatest tolerance to VKA.

2. Materials and methods

2.1. Animals

OFA-Sprague–Dawley rats were obtained from a commercial breeder (Charle Rivers, l'Arbresles, France) and acclimated for a minimal period of 5 days. The rats were housed four per cage under a constant photoperiod and ambient temperature. In order to characterize the VKOR activity, 8-weeks old OFA-Sprague–Dawley rats (4 males and 4 females) were killed by decapitation. Liver was removed quickly and microsomes were immediately prepared. In order to study the decay kinetics of the vitamin K-dependent blood clotting factors after administration of anticoagulants, 8-weeks old OFA-Sprague–Dawley rats (44 males and 44 females) have been fed with vitamin K3-deficient food (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France), at least 48 h before the beginning and during the experience. To explore the basal levels of blood parameters, a first group of 8 males and 8 females were killed 48 h after the beginning of the vitamin K3-deficient feeding. Blood was collected in citrate tubes (3.2%; 1:9 v/v) by intracardiac taking and liver was collected and frozen at -80°C . The other animals received by force-feeding a *per os* administration of 10 mg/kg of difethialone 48 h after the beginning of the vitamin K3-deficient feeding, then a group of 3 males and 3 females was killed 1, 2, 4, 8, 10, 13, 16, 20, 24, 32, 48 and 72 h after the difethialone administration. Blood was collected in citrate tubes (3.2%; 1:9 v/v) by intracardiac taking and liver was collected and frozen at -80°C .

2.2. Microsome preparation

Liver microsomes were prepared by differential centrifugations as described by Moroni (Moroni et al., 1995). Briefly, liver cells were resuspended in 50 mM Phosphate Buffer (pH 7.4) containing 1.15%

(w/v) of KCl. Liver cells were broken by Potter and further submitted to differential centrifugation continuously at 4°C . The 100,000 \times g pellet corresponding to the membrane fraction was resuspended by Potter homogenization in HEPES glycerol buffer (50 mM Hepes, 20% glycerol, pH 7.4). Microsomes were frozen at -80°C and used for kinetic analysis. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (Bradford, 1976) using serum albumin as a standard.

2.3. Vitamin K epoxide reductase activity

Microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity was assayed according to a modified protocol previously described by Thijssen (1987), Thijssen and Baars (1989) and Misenheimer and Suttie (1990). Briefly, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mg of total proteins. The reaction was started by the addition of vitamin K $>$ O solution in 1% Triton X-100. After incubation at 37°C for 30 min, the reaction was stopped by adding 4 mL of iced 1:1 isopropanol/hexane solution. After centrifugation at 5000 \times g for 10 min, the hexane layer was removed and dried under nitrogen. The dry residue was immediately dissolved in 0.2 mL of methanol and reaction product was analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry.

2.4. Vitamin K1 measurement

The LC–APCI/MS/MS used was a 6120 Quadrupole LC/MS with an Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) interface and a LCMS Chemstation software from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separation was performed using a XTerra MS C18 column (2.1 mm \times 50 mm, 2.5 μm , Waters, Milford, MA, USA) with a mobile phase of methanol, 0.1% acetic acid (96:4) in isocratic conditions. The column temperature was 48°C . The flow rate in the LC column was 0.4 mL/min. The injection volume was 20 μL . The temperature of the autosampler tray was set to 5°C and the samples were protected from the daylight. Detection was by MS with APCI source in positive mode. Nebulizer pressure was set to 60 psi, dry gas temperature to 350°C , dry gas flow to 5 L/min, and vaporizer temperature to 400°C . Capillary voltage was set to 4000 V, corona needle to 10 μA . Identification criteria for vit K₁ are the retention time ($t_r=3.9$ min) and the selected ion 451.4. Identification criteria for vit K₁ $>$ O are the retention time ($t_r=2.9$ min) and the selected ion 467.0. Linearity and accuracy were tested from 25 to 2000 ng/mL ($n=20$). The response was linear throughout the concentration range tested with a coefficient of correlation (r^2) above 0.99. Accuracy was between 80 and 120% of the theoretical concentrations.

2.5. Kinetics

Kinetic parameters (K_m and V_{max}) were obtained from at least two separate experiments after the addition of increasing amounts of vitamin K $>$ O (0.003–0.2 mM) to the standard reaction. The estimation of the kinetic parameters was achieved by the incubation of at least 8 different concentrations of vitamin K $>$ O. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis–Menten model using R software.

In order to evaluate the inhibiting effect of warfarin on VKOR activity, inhibition parameters (K_i) were determined after addition of various concentrations of warfarin to the standard reaction. Inhibition parameters were first assessed with 4 different concentrations (0.01, 1, 10 and 30 μM) and further more precisely determined using concentrations from about 0.05 to $20 \times K_i$. Data

were fitted by non-linear regression to the non-competitive inhibition model using Sigmaplot 9.0™ software.

2.6. Determination of difethialone concentration in liver

Tissue (1 g of tissue) was extracted with acetone by using an Ultra Turrax tissue disperser from IKA Labortechnik® (VWR International, Strasbourg, France). Extract was centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min. Supernatant was thus evaporated at 60°C under a gentle nitrogen flow. Dry extract was resuspended in acetonitrile/hexane (v/v 50/50). The hexane layer was eliminated and the rest was dried at 60°C under gentle nitrogen flow. The final dry extract was dissolved in methanol and difenacoum concentration was analysed by HPLC on a reverse phase C-18 column (4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$; Waters, Milford, MA, U.S.A.) at a detection wavelength of 260 nm. The C-18 column was heated 30°C . A gradient elution system was used with a flow rate of 1 mL/min: from 60% acetonitrile/40% water (acidified with 0.2% H_3PO_4) to 75% acetonitrile/25% water at 10 min. The detection limit and the quantification limit were 50 ng/g and 130 ng/g. The specificity of the analytical method was determined by the extraction of three different blank samples of each organs collected from adults rats. The method appeared selective for all the components. The noise level were estimated for each organs and the mean value plus three standard deviations or ten standard deviations were used respectively to calculate the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ). Spiked samples with decreasing concentrations were used to determine those limits chromatographically. The linearity and accuracy were determined on liver and plasma spiked samples. Three series of seven spiked samples were prepared (each one on different day) then extracted and analyzed. The linear regression equations of spiked samples were compared to standards calibration curves ($r^2 > 0.99$).

2.7. Quantitative real time-PCR

Total RNAs were extracted from liver first with the Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) then by using SV Total RNA Isolation System (Promega, Charbonnières, France). The RNA concentration and purity were analyzed using a UV-160A spectrophotometer (Shimadzu, Roucaire, France), measuring spectral absorption at 260 and 280 nm. cDNA templates were synthesized from 100 ng total RNAs in a final volume of $20 \mu\text{L}$ containing 500 pmol of oligo(dT)₁₈ and 200 units of Moloney murine leukemia virus Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol.

Quantitative real time-PCR reactions were performed with the MX3000P qPCR Machine (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) using primers for *Ggcx*, *Nqo1*, *Vkorc1*, *Vkorc111*, *Calu* (Calumenin), F2 (prothrombin), F7 (factor VII), F9 (factor IX) and F10 (factor X). *Gapdh* was used as housekeeping gene. The housekeeping gene was amplified under the same conditions used for the amplification of the target genes. Briefly, in a final volume of $20 \mu\text{L}$, 5 ng of cDNA were added to an optimal amplification reaction mixture containing 5X HOT BIOAmp Evagreen® qPCR Mix (Biofidal, Vaux-en-Velin, France) and 200 nM of each primer. Thermal cycling was the following: activation of the HOT BIOAmp® DNA Polymerase at 95°C for 5 min and 45 cycles of amplification (95°C for 20 s, 60°C for 60 s and 72°C for 30 s). To determine the specificity of amplification, analysis of product melting was conducted after the 45 cycles of amplification: a melting curve was obtained by increasing the temperature at a rate of 0.01°C per second from 60°C to 95°C . Expression was evaluated in duplicate. The point at which the PCR product is first detected above a fixed threshold, the thermal cycle threshold (C_t), was determined for each sample, and the average C_t

of duplicate sample was calculated. To determine the quantity of the target gene-specific transcripts present in different tissues relative to the control, their respective C_t values were normalized by subtracting the C_t value obtained from the *Gapdh* control ($rC_t = C_t \text{ target} - C_t \text{ control}$) and the relative concentration was determined with the following formula: 2^{-rC_t} .

2.8. Determination of clotting factor concentrations

Vitamin K-dependent clotting factors activities (II, VII, IX, X) were measured on citrated plasma using a chromogenic method on Konelab 30i (Thermoscientific) with Hyphen Biomed reagents.

More precisely, factor II was activated by incubation of citrate plasma with Echis Carinatus venom (0.25 mg/mL) in Tris-buffer (0.1 mM Tris HCl, pH 8.3 at 25°C , 0.2% BSA) at 37°C for 10 min. Thus, $50 \mu\text{g}$ of thrombin chromogenic substrate was added and absorbance was monitored at 405 nm for 1 min.

Factor VII activity was assayed by incubation of citrate plasma with calcium and tissue factor in excess to allow formation of tenase complexes and addition of a saturating concentration of human factor X activated in factor Xa proportionally to the quantity of tenase complexes formed. Thus, activity of factor Xa was monitored at 405 nm for 2 min after the addition of a specific chromogenic substrate generating para-nitroaniline in the presence of factor Xa.

Factor IX activity was assayed by an initial incubation of thrombin, calcium, phospholipids and Factor XIa with citrate plasma. The addition of a second reagent allowed to add factor VIII: C and factor X in the mixture. Thus, $50 \mu\text{g}$ of thrombin chromogenic substrate was added and absorbance was monitored at 405 nm for 1 min.

Factor X was activated by the addition of Russel's viper venom. Thus, $50 \mu\text{g}$ of thrombin chromogenic substrate was added and absorbance was monitored at 405 nm for 2 min.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis were performed with R v. 3.1.2. Results were expressed as mean values \pm SD or fitted value and confidence interval. Concerning the biochemical part, as the values are in small number, Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used to assess the difference between males and females. To compare results between males and females for the basal levels, Student tests were performed as values are normally distributed. For the decrease of each clotting factor after the administration of difethialone, data were linearized with a logarithmic function. Males and females regression curves were compared on the slope parameters with a Fisher test on the variance. The null hypothesis is that the male and female curves have the same slope.

3. Results

3.1. mRNA expression of key enzymes involved in the vitamin k cycle in liver

The presence of mRNA for *Ggcx*, *Vkorc1* or *Vkorc111* was assessed by real time PCR in liver of 8 weeks-old male and female OFA-Sprague-Dawley rats. Results are presented in Fig. 1. mRNA expression levels were presented relatively to the corresponding male mean mRNA expression level, which was set at 100%. Results are presented in percentage of expression compared to the expression level obtained in male. Expression levels of *Ggcx* and *Vkorc111* mRNA were similar between males and females. On the contrary, a significant difference between males and females was found concerning the expression of *Vkorc1* mRNA coding gene. *Vkorc1* mRNA was found to be 80% more expressed in female liver compared to males (Fig. 1).

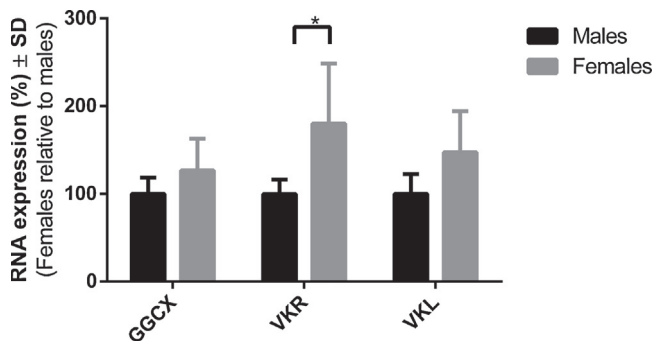


Fig. 1. Hepatic expression levels of genes coding for three enzyme implicated in the vitamin K cycle. GGCX: gene coding for gamma-glutamyl carboxylase; VKR: gene coding for VKORC1; VKL: gene coding for VKORC1L1. * denotes a significant difference between males and females at $\alpha=0.01$.

3.2. Vkor activity

To compare the ability to reduce vitamin K epoxide in vitamin K quinone between male and female rats, liver microsomes from 4 males and 4 females OFA-Spradue–Dawley rats were prepared. Then the catalytic properties of the VKOR activity measured in these microsomes were determined. K_m and V_{max} results are presented in Table 1. A statistic difference was found between males and females only concerning the V_{max} value. The specific activity of females was 2.4 fold higher than males.

3.3. Basal Levels in vitamin k-dependent clotting factors Activities

The concentrations of vitamin K-dependent clotting factors (*i.e.*, prothrombin, factor VII, factor IX and factor X) were measured in males and females 48 h after the beginning of the vitamin K3-deficient food. Concentrations were determined relatively for each factors to the corresponding male mean concentration factor (Fig. 2(A), Table 2) set at 100%. A significant difference was found between males and females for factor VII ($P < 0.001$) and factor X ($P = 0.006$) with a clotting factor concentration in females higher than males of respectively 43 and 21%. But considering the factor IX and the prothrombin no significant difference was found.

In addition, a study of the hepatic expression of vitamin K-dependent clotting factor genes: prothrombin, factor VII, factor IX and factor X was performed (Fig. 2B). mRNA expression levels were presented relatively to the corresponding male mean mRNA expression level, which was set at 100%. Only Factor VII expression was significantly different between males and females ($P < 0.001$), females' factor VII expression was 125 percent higher than males' factor VII expression.

3.4. Evolution of clotting factors after difethialone per os administration

In order to characterize the decay kinetics of vitamin K-dependent clotting factors, an elevated concentration of difethialone (10 mg/kg) was administered *per os* to 36 male and 36 female

Table 1

Kinetic parameters of VKOR activity measured in liver of male and female rats.

Gender	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_i (μM)
Males	48.9 (32.9–76.8)	72.9 (46.7–98.3)	0.26 (0.21–0.36)
Females	110.2 (75.87–173.6)	178.2 (129.6–280.6)	0.31 (0.13–0.45)
<i>P</i> -value	0.057	0.029	0.657

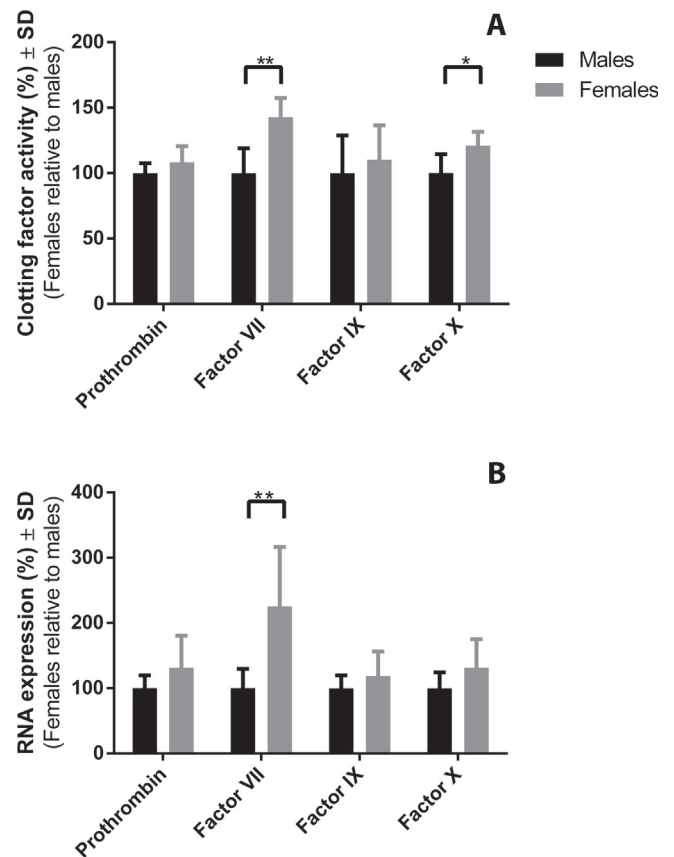


Fig. 2. Clotting factors activity (A) and hepatic expression (B) were measured after a 48 h diet with vitamin K devoid food and before difethialone *per os* administration. Values were compared between males (set at 100%) and females and presented as the mean \pm SD. * denotes a significant between males and females at $\alpha=0.01$. ** denotes a significant between males and females at $\alpha=0.001$.

rats previously fed with vitamin K3-deficient food for 48 h. For each rat prothrombin time was measured and vitamin K-dependent clotting factors activities (prothrombin, factor VII, factor IX and factor X) were measured in citrate plasma. For 3 males, the blood collection was impossible because of their premature death; the first one, ten hours after the difethialone administration and the others seventy-two hours after the administration. Necropsy has showed hemorrhagic lung and abdomen in these rats.

The evolution of prothrombin time after the administration of difethialone for male and female rats is presented in Fig. 3. After the linearization of data (Fig. 3(B)), a two steps evolution of prothrombin time was pinpointed. A lag time was present in both male and female prothrombin time evolutions. However, this lag time has occurred during 2 first hours in males and 8 first hours in females, lag time slopes were not different from 0 with respectively a *P*-value of 0.16 and 0.46. Then both prothrombin time evolution increased with a slope of 0.04 h^{-1} for male rats and 0.05 h^{-1} for female rats. The two increasing slopes were significantly different ($P < 0.001$).

The plasma activities of vitamin K-dependent clotting factors are represented in function of time after difethialone administration in Fig. 4. The activity values are represented relatively to the male basal level set at 100%. To assess the evolution of clotting factors, data were linearized with a natural logarithmic function (Fig. 4(X2)) allowing to determine the slope and the half-life (Table 3). A significant difference was observed between male rats and female rats for the prothrombin and the factor X slope values. Consequently, the half-lives of these two factors were different

Table 2
Values of parameters from linear regressions performed on linearized data of each clotting factor activity evolution after per os administration of difethialone. Values are presented with 95% confidence interval.

Clotting factors	Gender	Slope (h ⁻¹) absolute values	P-values	Half-live time (h)	R ²
Factor II	Male	0.071(0.065–0.078)	<0.001	9.7 (8.9–10.6)	0.9373
	Female	0.056 (0.051–0.061)		12.4 (11.3–13.6)	0.9421
Factor VII	Male	0.25 (0.22–0.27)	0.596	2.8 (2.6–3.1)	0.9375
	Female	0.23 (0.19–0.28)		3.0 (2.5–3.7)	0.8862
Factor IX	Male	0.061 (0.041–0.081)	0.362	11.4 (8.6–16.7)	0.6110
	Female	0.050 (0.038–0.063)		13.8 (11.0–18.4)	0.7327
Factor X	Male	0.13 (0.13–0.14)	0.0035	5.2 (5.0–5.4)	0.9872
	Female	0.12 (0.11–0.13)		5.7 (5.4–6.1)	0.9741

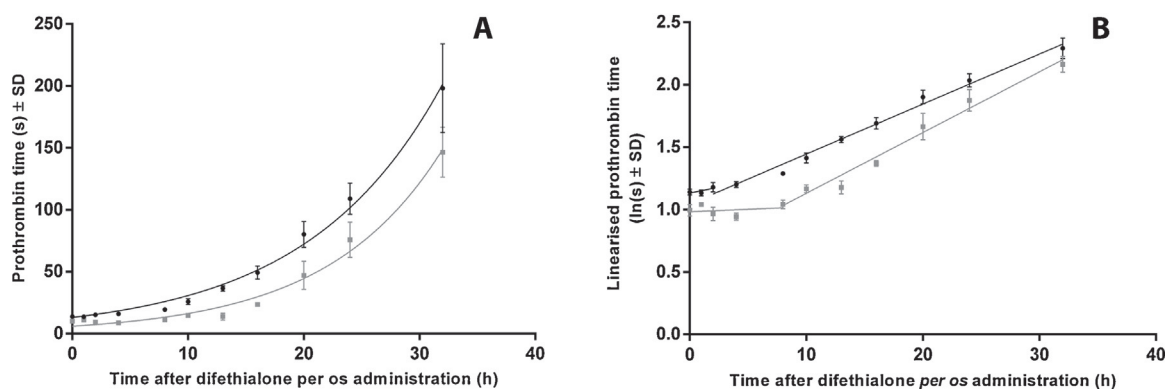


Fig. 3. Evolution of the prothrombin time after per os administration of 10 mg kg⁻¹ of difethialone. Values are presented for each time as mean more or less standard deviation, in second (A) or after linearization with logarithmic function (B). Males' values are presented in black and females' values are presented in grey.

between males and females. Concerning female factor VII, only values from 4 h were including in the linear regression. Indeed, during these 4 first hours, female factor VII activities did not decay. The slope of the female factor VII plateau was not significantly different from 0 (P -value = 0.409).

3.5. Evolution of the difethialone concentration in liver

One, 2, 4, 8, 10, 13, 16, 20, 24, 32, 48 and 72 h after the per os difethialone administration, difethialone concentration in plasma liver was determined. The concentration of difethialone in plasma (data not shown) and liver (Fig. 5) increased rapidly after an oral administration in males and females, reached a peak about 8–12 h after the administration, and then decreased slowly in a time-dependent manner. The maximal concentration in plasma and liver was significantly reached earlier in females ($T_{max} = 7.9$ h) than males ($T_{max} = 11.7$ h). Pharmacokinetic analyses (Table 3) revealed that C_{max} and $AUC_{0 \rightarrow 24 h}$ or $AUC_{0 \rightarrow 72 h}$ were significantly higher in females than males.

4. Discussion

The resistance of female rats to the administration of anticoagulants is a phenomenon well recognized (Gill et al., 1994; Kohn and Pelz, 1999). In practice, discriminating doses of anticoagulants, called ED50 (i.e., effective dose 50), were determined in rats to characterize the susceptibility of rats to anticoagulants. ED50 corresponds to the dose leading to 50% of animals tested with a 5-fold increase of the International Normalized Ratio 24 h after the administration of anticoagulants. Systematically for all the anticoagulant molecules used as rodenticides, the ED50, determined by the Rodenticide Resistance ACTION Committee (2003),

are higher for female rats than males. For example, as recommended by the technical monograph of 2003, ED50 for difethialone is 0.4 mg kg⁻¹ for male rats; it is 0.5 mg kg⁻¹ for females. Contrary to rats, in humans, the differences in responses after antivitamin K anticoagulants between men and women are difficult to appreciate. In healthy individuals, available studies are logically always performed with small doses of antivitamin K anticoagulants, while in diseased individuals, used doses and molecules of VKA are often different and moreover, the first evaluations of the coagulation are generally made 3 days after the initiation of the treatment.

Since the pinpointing of the female rats tolerance to VKA, many assumptions on its origin have been issued. Is the pharmacokinetics of VKA different between males and females? Is the recycling of vitamin K and more precisely the VKORC1 enzyme more resistant to VKA in females than males? Is the half-life of vitamin K-dependent clotting factors longer in females than males? Is the vitamin K storage higher in females than males?

To answer these questions, the greater tolerance of the female rats to VKA was first characterized after administration of 10 mg kg⁻¹ of difethialone by following the time-dependent evolution of the prothrombin time. Difethialone was chosen in this study because it is one of the most powerful rodenticides. No resistance to this molecule has been described until now (Hodroge et al., 2011). An excessive dose of difethialone, corresponding approximately to 20-fold the DL50 (Petterino and Paolo, 2001), was administered to male and female rats. In these conditions, we can assume that VKORC1 is totally inhibited in males, but also, in females since the inhibition constants of the VKOR activity towards VKA are not different between sexes. Moreover, we can also assume that the complete inhibition of the VKOR activity occurs at the same time, in the liver of male and female rats. Indeed, after per os administration, difethialone is totally and rapidly absorbed. The

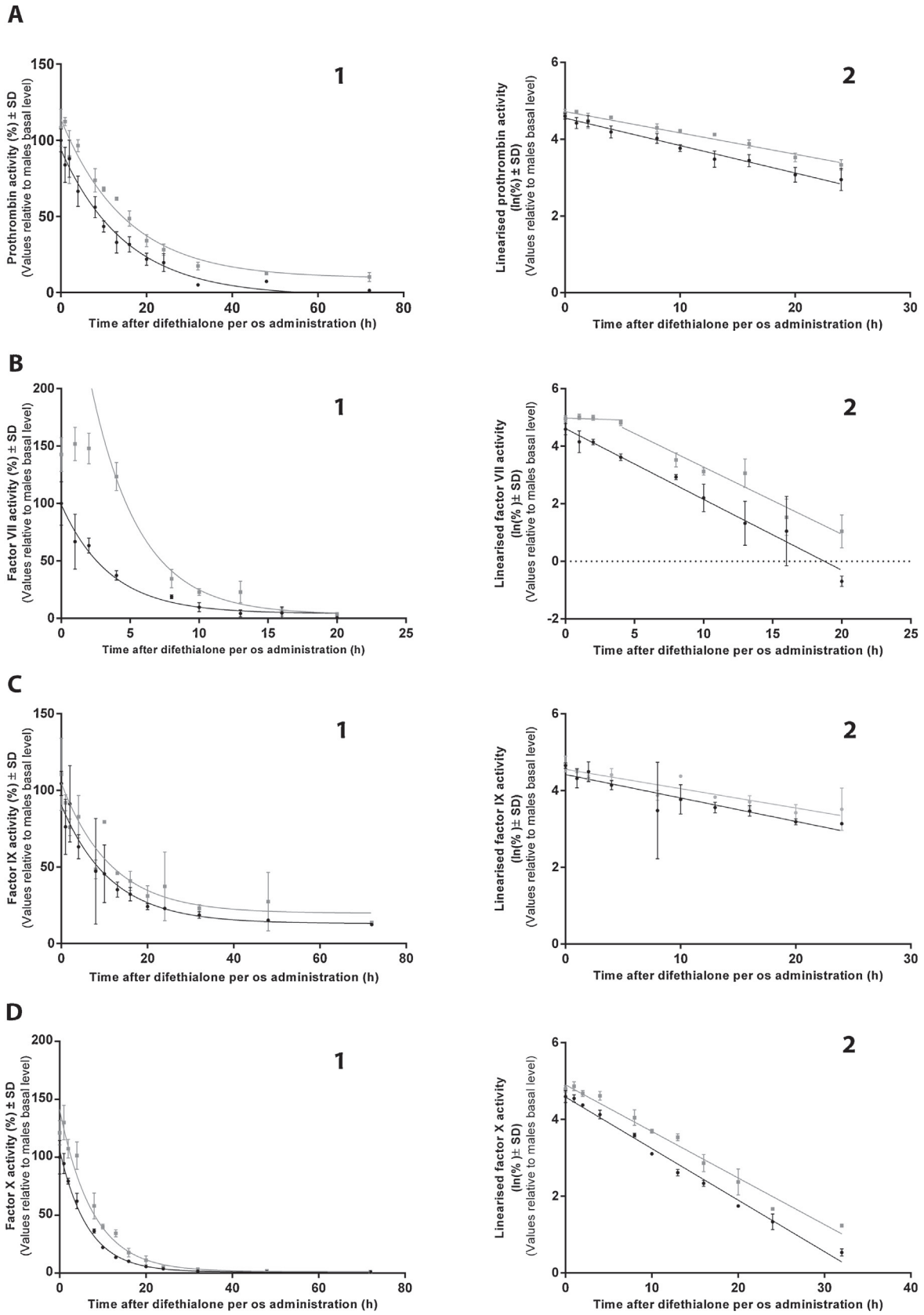


Fig. 4. Evolution of activity of the four vitamin K dependent clotting factors and their linearization after a per os administration of difethialone: prothrombin (A); factor VII (B); factor IX (C); factor X (D). The (1) graphs represent the relative mean of activity for each time and their standard deviation; for each factor, the basal concentrations' mean of male rats is set at 100%. The (2) graphs present the same values after linearization by a logarithmic function. Males' values are presented in black and females' values are presented in grey.

Table 3
Hepatic pharmacokinetic summary of difethialone treatment in male and Female.

	AUC _{0–24h} ($\mu\text{g/g h}$)	AUC _{0–72h} ($\mu\text{g/g h}$)	C _{max} ($\mu\text{g/g}$)	T _{max} (h)
Male	753 \pm 123*	1921 \pm 291	36.3 \pm 6.0	11.7 \pm 0.06
Female	1376 \pm 209*	3578 \pm 560	64.5 \pm 9.7	7.9 \pm 0.3
P-value	<0.05	<0.05	<0.05	<0.001

concentration peak in liver occurring sooner in female rats, a faster absorption of difethialone in females can be supposed. Thus, a complete inhibition of VKORC1 in the liver could even occur earlier in females. Moreover, the liver concentration of difethialone was systematically higher in females than males, as described for warfarin (Zhu and Shin, 2005) suggesting a lower metabolism or elimination of difethialone in females than males. Therefore, complete inhibition of VKORC1 is assumed to be at least equivalent between males and females during the first 24 h following the administration of difethialone.

This complete inhibition of VKORC1 results in a significant increase of prothrombin time 24 h after the administration of difethialone in males, but also in females. Nevertheless, a lag of at least eight hours in the increase of the prothrombin time was pinpointed in females compared to males (Fig. 3). The lag time was sufficiently important to keep the females' prothrombin times significantly lower than males' for 24 h, even though the increase of the prothrombin time was significantly higher in females than in males after the lag. Moreover, only males were found dead during the study and the necropsy confirmed the hypocoagulability as the origin of the death. These results argue for a highest tolerance of females compared to rats at least during the first 24 h and this highest tolerance is not due to a pharmacokinetically- or pharmacodynamically-mediated difference in the inhibition of VKORC1 enzyme.

To go further in the understanding of the origin of females' tolerance, vitamin K-dependent clotting factors activities were measured. Even before the administration of VKA, significant differences were found between males and females. Basal clotting factor VII and X activities were found to be significantly higher in females than males. These results are in agreement with previous results obtained in Wistar rats where factors II and X activities were also observed to be higher in females than males (Kerins and MacNicol, 1999). In humans, all vitamin K-dependent clotting factors activities were also reported to be higher in women (Favaloro et al., 2005). In OFA-Sprague–Dawley rats, these highest activities in females' livers do not seem to be due to higher mRNA

syntheses in liver, except eventually for factor VII. Indeed, only, mRNA encoding factor VII were found to be 2.3-fold more expressed in female rats' livers than males, The expression levels of the other mRNA encoding factors II, IX and X were similar between males and females. The highest factor VII and X plasma activities observed in females might be explained by the highest rate of the VKOR activity measured in females livers (*i.e.*, 2.4 fold) compared to males. These highest basal activity of active vitamin K-dependent clotting factors in females are certainly involved in the explaining of the sex-linked clotting time differences previously observed (Lemini et al., 2007). Moreover, this higher initial pool of active vitamin K-dependent clotting factors VII and X might be a part of the explanation of the highest tolerance of the female rats. Nevertheless, this initial difference is strengthened by longer decay kinetics of vitamin K-dependent clotting factors II, VII and X in females after administration of difethialone. Indeed, half-lives of factors II and X are significantly higher in female rats than males, with half-lives longer of respectively 2.7 and 0.5 h. For factor VII, no difference of half-lives was observed between males and females. Nevertheless, this absence of difference is due to the calculation method. Since factor VII activities were not modified between the first 4 h following difethialone administration in females, the calculation of half-life in female was performed in this study considering only the results obtained after the first 4-hours period. Therefore, when the lag time is included in the calculation, loss of 50% of active factor VII activity is reached in 5.8 h after difethialone administration in females while in males the same loss is reached in only 2.8 h. Such lag times were previously reported in rats for factors II, VII and X by Kerins and MacNicol (1999). Nevertheless, lag times were observed in females, but also in males. In our study, the use a vitamin K3-deficient food for a preliminary period of 48 h before difethialone administration led to an absence of lag times in males for all vitamin K-dependent clotting factors and an absence of lag time in females for factor II and X. The lag time observed in females before the degradation of the factor VII is observed while the VKORC1 enzyme is totally inhibited. The maintained factor VII clotting factor activity might be due to a maintained GGCX activity which is strictly dependent on the bioavailability of vitamin K hydroquinone. This suggests the presence of a storage of vitamin K in female livers only allowing the preservation of the gamma-carboxylation function during the first hours following the VKA-induced inhibition of the vitamin K recycling. The recycling of vitamin K in males should allow to produce just the vitamin K necessary for the physiological needs. In females, this recycling might produce more vitamin K than the physiological. Previous study has already showed that the liver concentration of vitamin K is more important in female rats than in males (Huber et al., 1999). This stock of vitamin K in females seems to be used after the inhibition of the VKOR activity to preferentially maintain the gamma-carboxylation of factor VII, which plays a crucial role in the initiation of the coagulation. The binding of the gamma-carboxylase to its protein substrates is mediated by a propeptide sequence present in all vitamin K-dependent proteins. Depending of the sequence of this propeptide, its apparent affinities for the carboxylase vary over a 100-fold range. Thus, it was shown that human factor VII and factor X propeptides have higher affinities for the gamma-carboxylase than other propeptides (Chu et al., 1996; Stanley et al., 1999). In rats, no information is available. Our results suggest in rats a higher affinity of the gamma-carboxylase for the propeptide of factor VII compared to those of factor II and X. As the affinity of the gamma-carboxylase for the propeptide is determined by the propeptide sequence, it would be assumed that the gamma-carboxylase affinity is similar between male rats and females. Consequently, the absence of the plateau before the decay kinetics of factor VII and the shortest half-lives of factors II and X in males

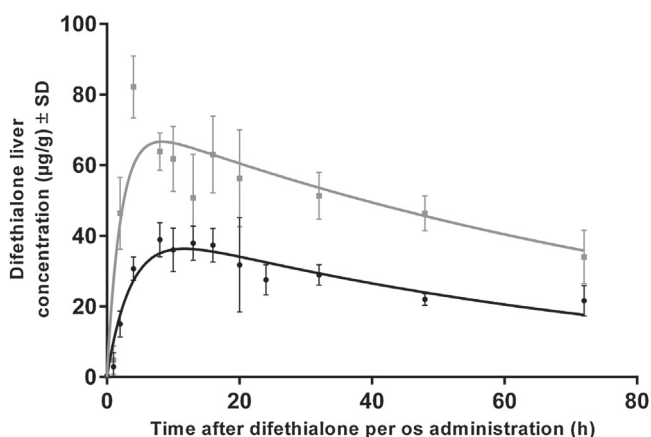


Fig. 5. Evolution of difethialone concentration in liver after difethialone per os administration. Males' concentrations are presented in black and females' concentrations are presented in grey.

are certainly due, after the inhibition of the vitamin K cycle, to the absence of the cofactor of the gamma-carboxylase, the vitamin K hydroquinone, while in females the stock of vitamin K allowed to maintain the gamma-carboxylation of factor VII and in a lesser extent factors II and X during few hours after difethialone administration.

5. Conclusion

The tolerance of female rats to vitamin K antagonist administration is due to both the basal level of their vitamin K-dependent clotting factor activities and the half-lives of these clotting factors. Factor II, VII and X activities are higher in females than male rats. Moreover, plasmatic half-lives of prothrombin and factor X are higher in female too. Concerning factor VII in female rats, a lag time before its decay has been observed only in females and seems to be crucial in the tolerance of females to VKA.

Acknowledgement

This work was supported by grant ISI no. I1301001W “NEO-RAMUS” from Bpi France.

References

- Bandyopadhyay, P.K., 2008. Vitamins & Hormones, Vitamin K. In: Litwack, G. (Ed.), Vitamin K-Dependent γ -Glutamylcarboxylation: An Ancient Posttranslational Modification. Academic Press, pp. 157–184.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cain, D., Hutson, S.M., Wallin, R., 1998. Warfarin resistance is associated with a protein component of the vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in rat liver. *Thromb. Haemost.* 80, 128–133.
- Chu, K., Wu, S.M., Stanley, T., Stafford, D.W., High, K.A., 1996. A mutation in the propeptide of Factor IX leads to warfarin sensitivity by a novel mechanism. *J. Clin. Invest.* 98, 1619–1625.
- Favaloro, E.J., Soltani, S., McDonald, J., Grezchnik, E., Easton, L., 2005. Cross-laboratory audit of normal reference ranges and assessment of ABO blood group: gender and age on detected levels of plasma coagulation factors. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 16, 597–605.
- Ferland, G., 2012. The discovery of vitamin K and its clinical applications. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 213–218.
- Furie, B., Bouchard, B.A., Furie, B.C., 1999. Vitamin K-dependent biosynthesis of γ -carboxyglutamic acid. *Blood* 93, 1798–1808.
- Gill, J.E., Kerins, G.M., Langton, S.D., MacNicol, A.D., 1994. Blood-clotting response test for bromadiolone resistance in Norway rats. *J. Wildl. Manag.* 58, 454–461.
- Guenther, T.M., Cai, D., Wallin, R., 1998. Co-purification of microsomal epoxide hydrolase with the warfarin-sensitive vitamin K1 oxide reductase of the vitamin K cycle. *Biochem. Pharmacol.* 55, 169–175. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00431-0.
- Harauchi, T., Takano, K., Matsuura, M., Yoshizaki, T., 1986. Liver and plasma levels of descarboxyprothrombin (PIVKA II) in vitamin K deficiency in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 40, 491–499.
- Hodroge, A., Longin-Sauvageon, C., Fourel, I., Benoit, E., Lattard, V., 2011. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch. Biochem. Biophys.* 515, 14–20. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2011.08.010.
- Hodroge, A., Matagrini, B., Moreau, C., Fourel, I., Hamed, A., Benoit, E., Lattard, V., 2012. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J. Thromb. Haemost.* 10, 2535–2543. doi:http://dx.doi.org/10.1111/jth.12019.
- Huber, A.M., Davidson, K.W., O'Brien-Morse, M.E., Sadowski, J.A., 1999. Tissue phyloquinone and menaquinones in rats are affected by age and gender. *J. Nutr.* 129, 1039–1044.
- Kerins, G.M., MacNicol, A.D., 1999. Comparison of the half-lives and regeneration rates of blood clotting factors II, VII, and X in anticoagulant-resistant and susceptible Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122, 307–316.
- Kohn, M.H., Pelz, H.J., 1999. Genomic assignment of the warfarin resistance locus *Rw* in the rat. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 10, 696–698.
- Lemini, C., Jaimez, R., Franco, Y., 2007. Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice. *Thromb. Res.* 120, 415–419.
- Li, T., Chang, C.-Y., Jin, D.-Y., Lin, P.-J., Khvorova, A., Stafford, D.W., 2004. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427, 541–544. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature02254.
- Markussen, M.D., Heiberg, A.-C., Fredholm, M., Kristensen, M., 2008. Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: a possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance. *Pest Manag. Sci.* 64, 239–248.
- Markussen, M.D., Heiberg, A.-C., Fredholm, M., Kristensen, M., 2007. Characterization of bromadiolone resistance in a danish strain of Norway rats, *rattus norvegicus*, by hepatic gene expression profiling of genes involved in vitamin K-dependent γ -carboxylation. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 373–381.
- Misenheimer, T.M., Suttie, J.W., 1990. Warfarin resistance in a Chicago strain of rats. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2079–2084.
- Moroni, P., Longinsauvageon, C., Benoit, E., 1995. The flavin-containing monooxygenase in rat liver: evidence for the expression of a second form different from FMO1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 820–826.
- Mugford, C.A., Kedderis, G.L., 1998. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 30, 441–498. doi:http://dx.doi.org/10.3109/03602539808996322.
- Oldenburg, J., Bevens, C.G., Müller, C.R., Watzka, M., 2006. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 347–353.
- Pelz, H.-J., Rost, S., Hünerberg, M., Fregin, A., Heiberg, A.-C., Baert, K., MacNicol, 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.
- Pelz, H.-J., Rost, S., Müller, E., Esther, A., Ulrich, R.G., Müller, C.R., 2012. Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Manag. Sci.* 68, 254–259.
- Petterino, C., Paolo, B., 2001. Toxicology of various anticoagulant rodenticides in animals. *Vet. Hum. Toxicol.* 43, 353–360.
- Rodenticide Resistance ACTION Committee, 2003. Areappraisal of blood clotting response tests for anticoagulant resistance and a proposal for a standardized BCR test methodology. Technical Monograph 2003. Crop Life International, Brussels.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H.-J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G.D., Müller, C.R., Strom, T.M., Oldenburg, J., 2004. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427, 537–541.
- Stanley, T.B., Humphries, J., High, K.A., Stafford, D.W., 1999. Amino acids responsible for reduced affinities of vitamin K-dependent propeptides for the carboxylase. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 11568–115687.
- Thijssen, H.H.W., 1987. Warfarin resistance: vitamin K epoxide reductase of scottish resistance genes is not irreversibly blocked by warfarin. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2753–2757.
- Thijssen, H.H.W., Baars, L.G.M., 1989. Microsomal warfarin binding and vitamin K 2,3-epoxide reductase. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1115–1120.
- Waxman, D.J., 1988. Interactions of hepatic cytochromes P-450 with steroid hormones: regioselectivity and stereospecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P-450 enzyme expression. *Biochem. Pharmacol.* 37, 71–84.
- Wallin, R., Hutson, S.M., Cain, D., Sweatt, A., Sane, D.C., 2001. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB J.* doi:http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0337fje.
- Watzka, M., Geisen, C., Bevens, C.G., Sittlinger, K., Spohn, G., Rost, S., Seifried, E., Müller, C.R., Oldenburg, J., 2011. Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J. Thromb. Haemost.* 9, 109–118. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04095.x.
- Zhu, X., Shin, W.G., 2005. Gender differences in pharmacokinetics of oral warfarin in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 26, 147–150.

IV. AUTRES TRAVAUX

IV.1 OBJECTIFS

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu l'occasion de m'investir dans d'autres projets de l'unité de recherche. Ceux-ci portent sur la recherche de nouveaux AVK efficaces sur les rongeurs résistants et moins écotoxiques. La problématique de l'écotoxicologie des AVK est en résonance avec ma thématique de recherche. En effet, si une dose d'anticoagulant plus importante est nécessaire pour être efficace sur les rats femelles cela implique un risque plus élevé de contaminations secondaires. Ainsi, il serait préférable d'avoir des AVK efficaces et peu rémanents. Or les seules demi-vies hépatiques des anti-vitamines K décrites actuellement dans la littérature sont de 300 jours pour certaines molécules. **L'objectif de ce travail est d'étudier les propriétés de certains AVK afin de proposer des solutions efficaces et durables dans la gestion des populations de rongeurs.** L'axe principal de cet objectif est l'étude des anticoagulants naturellement produits par la grande fêrulle (*Ferula communis*). Cette étude tente de déterminer à la fois les conditions de production de ces molécules et leur efficacité dans l'inhibition du cycle de régénération de la vitamine K. Enfin, nous avons étudié les diastéréoisomères de certains AVK afin de déterminer s'ils possèdent les propriétés recherchées.

IV.2 STRATEGIE

Pour ce qui concerne l'étude des opportunités de nouveaux AVK, nous avons sélectionné deux voies : les anticoagulants de la fêrule et les diastéréoisomères des AVK de seconde génération. En raison des connaissances actuelles d'un niveau bien différent sur ces deux axes nous avons dû développer deux approches différentes.

Pour les anticoagulants de la fêrule, nous avons dû, dans un premier temps, vérifier que ces molécules étaient bien des AVK. En effet, si les symptômes des animaux intoxiqués et la structure chimique des molécules pouvaient faire penser à des AVK, l'activité inhibitrice des molécules sur VKORC1 n'avait pas été caractérisée. Dans un second temps, nous avons tenté de comprendre pourquoi certains plants de fêrules sont toxiques et d'autre non.

Concernant les diastéréoisomères des AVK de seconde génération, nous avons étudié les pharmacocinétiques et les pouvoirs inhibiteurs de différents diastéréoisomères d'AVK, dans le but de déterminer quelles molécules étaient à la fois efficaces et peu rémanentes.

IV.3 ETUDES

IV.3.1 Article 5 : Comparaison des effets inhibiteurs du féruléol et de la ferprenine, contenus dans le chémotype toxique de *Ferula communis*, sur l'activité VKORC1 des foies de mammifère

Titre anglais : Comparative inhibitory effect of prenylated coumarins, ferulenol and ferprenin, contained in the 'poisonous chemotype' of *Ferula communis* on mammal liver microsomal VKORC1 activity

IV.3.1.1 Objectif

L'objectif de ce travail est de déterminer la capacité d'inhibition des composants de la grande férule (*Ferula communis*) ayant des propriétés anti-vitamine K. Ce travail a un double intérêt : déterminer les sensibilités spécifiques des espèces pouvant s'intoxiquer avec cette plante ; caractériser l'efficacité des molécules d'intérêt sur le rat.

IV.3.1.2 Protocole

Des microsomes sont préparés par centrifugation différentielle à partir de foies de veaux, vaches, chèvre, chevaux, sanglier, agneaux et rats. Les caractéristiques enzymatiques de chaque microsome sont alors déterminées. Enfin, la constante d'inhibition de trois AVK, les deux contenus dans la grande férule (le féruléol et la ferprénine) et la warfarine pour servir de référence.

IV.3.1.3 Principaux résultats

Cette expérience a permis de caractériser les propriétés inhibitrices du féruléol et de la ferprénine. Les résultats détaillés sont présentés dans l'article ci-dessous. Le Tableau VIII reprend les principales valeurs.

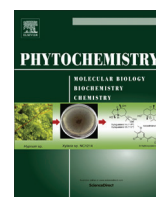
Tableau VIII : Résumé des constantes d'inhibition du féruléol, de la ferprénine et de la warfarine sur les microsomes de foie appartenant à différentes espèces.

Espèces	Ki du Féruléol (gM)	Ki de la ferprénine (μ M)	Ki de la warfarine (μ M)
Vache	0.13 \pm 0.06	16.6 \pm 1.2	2.3 \pm 0.4
Veau	0.04 \pm 0.01	5.2 \pm 1.4	2.5 \pm 0.1
Chèvre	0.04 \pm 0.02	2.8 \pm 1.4	1.6 \pm 1.3
Agneau	0.03 \pm 0.01	8.0 \pm 4.0	0.8 \pm 0.2
Porc	0.04 \pm 0.01	10.3 \pm 1.9	1.2 \pm 0.2
Sanglier	0.08 \pm 0.02	3.7 \pm 0.6	0.8 \pm 0.1
Cheval	0.04 \pm 0.01	16.3 \pm 2.1	1.3 \pm 0.3
Rat	0.03 \pm 0.01	1.9 \pm 0.4	0.5 \pm 0.1



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem

Comparative inhibitory effect of prenylated coumarins, ferulenol and ferprenin, contained in the 'poisonous chemotype' of *Ferula communis* on mammal liver microsomal VKORC1 activity



Marie-Sophie Louvet^{a,1}, Gilbert Gault^{a,1}, Sébastien Lefebvre^a, Florence Popowycz^b, Manon Boulven^b, Stéphane Besse^a, Etienne Benoit^a, Virginie Lattard^{a,*}, Denis Grancher^a

^aUSC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France

^bLaboratoire de Chimie Organique et Bio-organique, Institut National des Sciences Appliquées (INSA-Lyon), ICBMS-CNRS-UMR 5246, 20 Avenue Albert Einstein, F-69621 Villeurbanne Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 June 2015

Received in revised form 17 August 2015

Accepted 19 August 2015

Available online 24 August 2015

Keywords:

Ferula communis L. (Apiaceae)

Ferulenol

Ferprenin

VKORC1

Inhibition constant

Interspecies variability

ABSTRACT

Two distinguishable chemotypes of *Ferula communis* have been described: the 'nonpoisonous' chemotype, containing as main constituents the daucane esters; and the 'poisonous' chemotype containing prenylated coumarins, such as ferulenol and ferprenin. Ferulenol and ferprenin are 4-oxygenated molecules such as dicoumarol and warfarin, the first developed antivitamin K molecules. Antivitamin K molecules specifically inhibit VKORC1, an enzyme essential for recycling vitamin K. This latest is involved in the activation of clotting factors II, VII, IX, X. The inhibiting effect of ferulenol on VKORC1 was shown in rat, but not for species exposed to *F. communis* while in vivo studies suggest differences between animal susceptibility to ferulenol. The inhibiting effect of ferprenin on VKORC1 was never demonstrated. The aim of this study was to compare the inhibiting effect of both compounds on VKORC1 of different species exposed to *F. communis*. Vitamin K epoxide activity was evaluated for each species from liver microsomes and inhibiting effect of ferulenol and ferprenin was characterized. Ferulenol and ferprenin were shown to be able to inhibit VKORC1 from all analyzed species. Nevertheless, susceptibility to ferulenol and ferprenin presented differences between species, suggesting a different susceptibility to 'poisonous' chemotypes of *F. communis*.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ferula communis L. (Apiaceae) is a perennial and robust weed, native to the Mediterranean basin. Its presence was reported in Syria, Turkey, North Africa, Italy, Sardinia, Portugal, Greece, Croatia, Albania and Palestine (Cauwet-Marc, 1981; Infante, 1965). Consumption of *F. communis* L. has been reported to be associated to an hemorrhagic syndrome, also called ferulosis, often fatal in the absence of treatment (Cauwet-Marc, 1990). This intoxication affected almost all mammals and the National Center of Veterinary Toxicology of Lyon (France) diagnosed 28 clinical cases of *Ferula communis* intoxication in cattle, sheep, pig and horse from 1990 to 2013 (Gault et al., 2015). Even man may be affected after an

uncontrolled therapeutic use of *Ferula* extract (Cornevin, 1887; Lannehoa et al., 1998).

Two distinguishable chemotypes of *F. communis* L. were reported: the 'non-poisonous' chemotype and the 'poisonous' chemotype associated to the hemorrhagic syndrome (Benkhalti and Lamnaouer, 1994; Sacchetti et al., 2003). Different chemical investigations have reported the presence of daucane esters or drimane ethers, as main constituents in the 'non-poisonous' chemotype, according to the geographic area and the presence of prenylated coumarins as main constituents in the 'poisonous' chemotype (Appendino et al., 1987, 2001; Fraigui et al., 2001; Miski and Mabry, 1985; Valle et al., 1987; Rubiolo et al., 2006). Among the prenylated coumarins of the toxic variety, both ferulenol, a 4-hydroxycoumarin derivative, and ferprenin, a pyrane (3,2-c) coumarin derivative (Appendino et al., 1988; Carboni et al., 1964) (Fig. 1) could affect blood clotting, as described for other 4-oxygenated coumarin derivatives such as dicoumarol or warfarin, the first developed antivitamin K molecules used in human medicine and as rodenticide for pest control.

Abbreviations: VKOR, vitamin K epoxide reductase; VKORC1, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1; Vitamin K > O, vitamin K epoxide.

* Corresponding author.

E-mail address: virginie.lattard@vetagro-sup.fr (V. Lattard).

¹ Authors contributed equally to this article.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.012>

0031-9422/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

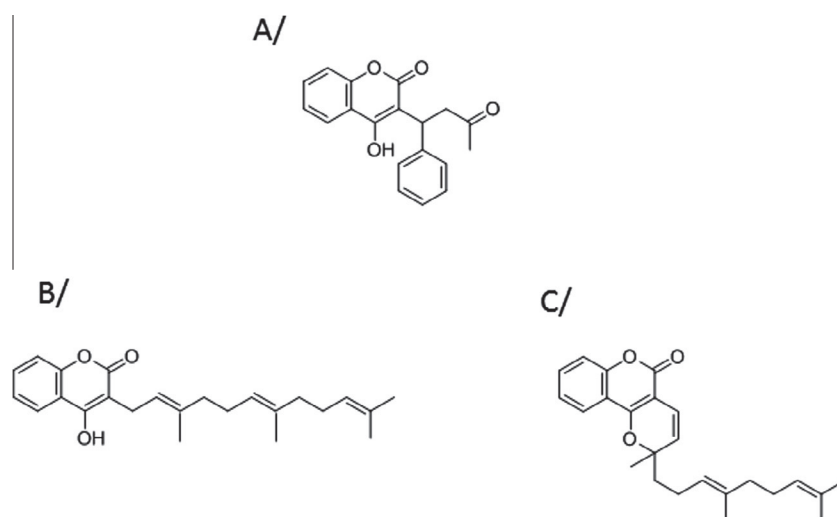


Fig. 1. Chemical structures of warfarin (A), ferulenol (B) and ferprenin (C).

4-Hydroxycoumarin derivatives, also designed as antivitamin K molecules were reported to specifically inhibit VKORC1, an enzyme encoded by the recent discovered *Vkorc1* gene (Li et al., 2004; Rost et al., 2004). This enzyme catalyzes the vitamin K 2,3-epoxide reductase activity. This enzymatic activity is essential for recycling vitamin K. The function of VKORC1 is to regenerate vitamin K and vitamin K hydroquinone (K and KH₂) from vitamin K 2,3-epoxide (K > O), a byproduct of the vitamin K-dependent gamma carboxylation reaction (Oldenburg et al., 2008). Inhibition of VKORC1 by 4-hydroxycoumarin derivatives limits the amount of KH₂ available for the carboxylation reaction and results in partially carboxylated vitamin K-dependent blood clotting factors II, VII, IX, X. The specific inhibition of VKORC1 results in a stop of the clotting factors activation leading to a delayed death by hemorrhage. The inhibiting effect of ferulenol on VKORC1 was shown in rat (Gebauer, 2007), but not on VKORC1 of species exposed to *F. communis* L.

Previous studies in sheep treated with ferulenol indicated a sharp decrease in activity for several coagulation factors (Tligui et al., 1994). This observation seems to be coherent with the VKORC1-mediated antivitamin K properties of 4-oxygenated coumarins. Nevertheless, another mechanism leading to decrease in coagulation factors was proposed. This decrease was proposed to be due to an impairment of coagulation factors biosynthesis induced by a cytotoxic effect of ferulenol (Monti et al., 2007). Moreover, the toxicity of *F. communis* L. was reported to be not correlated with its contents in ferulenol (Appendino et al., 1988) and another prenylated coumarin, the pyranoferprenin, isolated from *F. communis* L., showed in vivo haemorrhagic activity (Appendino et al., 1988). Nevertheless, the inhibiting effect of ferprenin on VKORC1 was never demonstrated. This study aims to compare the inhibiting effect of ferulenol and ferprenin on VKORC1 from different species in order to demonstrate the mode of action of phytochemicals presumed to be responsible for the toxicity of *F. communis*, plant associated to intoxication that has considerable importance in plant/animal interactions in the Mediterranean countries.

2. Results

2.1. Determination of vitamin K epoxide reductase activity in liver of animal species susceptible to be exposed to *F. communis* L

In order to evaluate the vitamin K recycling ability of animal species exposed to *F. communis* L., liver microsomes were prepared from cow, calf, goat, lamb, pig, boar and horse. VKOR activity was

thus measured at saturating concentration of vitamin K epoxide substrate (i.e., 200 μM) from the various microsomal fractions. Fig. 2 presents the results obtained. All the liver microsomal fractions tested in this study were able to reduce vitamin K epoxide in vitamin K. VKOR activities were found statistically different between species (VKOR activities determined from horse and boar were excluded of the one way analysis of variance). VKOR activity measured in cow liver microsomes was 1.5–2-fold higher than that measured in goat, lamb and pig liver.

2.2. Determination of the inhibiting effect of ferulenol and ferprenin on vitamin K epoxide reductase activity

In order to analyze the efficiency of ferulenol and ferprenin as inhibitor of the VKOR activity, susceptibilities to ferulenol and ferprenin were first determined in the presence of calf liver microsomes. The plots of the velocity of the VKOR activity catalyzed by calf liver microsomes, versus the substrate concentration in the presence of different concentrations of ferulenol or ferprenin are presented in Fig. 3A and B, respectively. The inhibiting effects of ferulenol and ferprenin on VKOR activity catalyzed by calf liver microsomes were compared with that obtained in the same conditions with warfarin (Fig. 3C).

Ferulenol was able to inhibit VKOR activity. The addition of ferulenol did not modify the apparent K_m ($40.3 \pm 5 \mu\text{M}$), while it decreased the apparent V_{max} (Fig. 3A). Ferulenol is thus able to inhibit VKOR activity catalyzed by calf liver microsomes in a non-competitive manner, as observed with warfarin (Fig. 3C). Data were fitted to the Michaelis–Menten model, which takes into account the presence of either competitive, non-competitive, or uncompetitive inhibitor by non-linear regression. A fit was possible when the model that takes into account a non-competitive inhibitor was used only. Finally, K_i towards ferulenol for calf liver microsomes was $0.076 \pm 0.007 \mu\text{M}$. K_i towards warfarin obtained in the same conditions was $0.51 \pm 0.04 \mu\text{M}$.

Ferprenin was also able to inhibit the VKOR activity catalyzed by calf liver microsomes, but with concentration much higher than those used for inhibition of VKOR activity by ferulenol (Fig. 3B). Ferprenin inhibited the VKOR activity in a non-competitive manner, as described for ferulenol. K_i towards ferprenin for calf liver microsomes was $8.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$. VKOR activity in calf liver microsomes was thus 100-fold more resistant to the action of ferprenin than ferulenol.

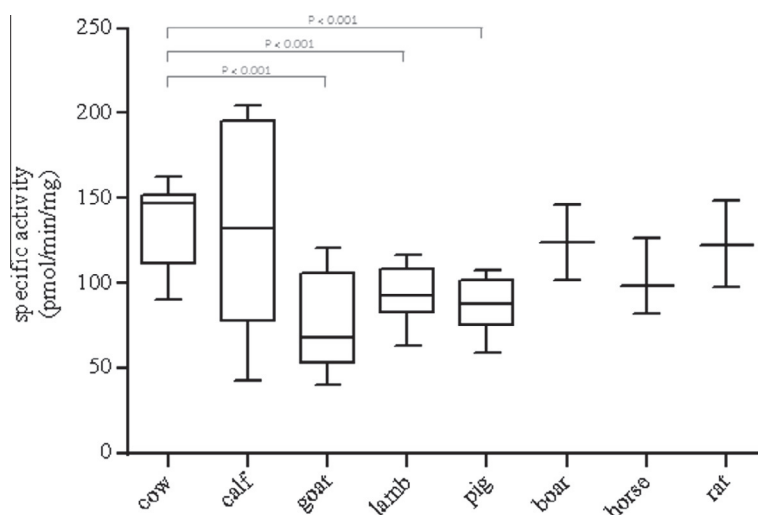


Fig. 2. Vitamin K epoxide reductase activity in animals exposed to *F. communis* L. Enzyme activity was evaluated in the presence of 200 μ M of KOX and 1 mg of liver microsomal proteins. Each data point represents the mean \pm SD of three individual determinations.

2.3. Determination of the species variability of the VKORC1-inhibiting effect of ferulenol

In order to analyze the variation of the efficiency of ferulenol as inhibitor of VKOR activity in the animals exposed to *F. communis* L., K_i values for ferulenol were determined in liver microsomal fractions from cow, goat, lamb, pig, horse and boar and compared to K_i obtained for rat liver microsomes. Ferulenol inhibited the VKOR activity in a non-competitive manner for all the microsomal fractions we analyzed (data not shown). The K_i values for ferulenol are in Table 1. They were found statistically different between species (K_i determined from horse and boar were excluded of the one way analysis of variance). K_i for ferulenol determined in cow liver microsomes was 3- to 3.8-fold higher than that measured in calf, goat, lamb, pig and rat liver.

2.4. Determination of the species variability of the VKORC1-inhibiting effect of ferprenin

In order to analyze the variation of the efficiency of ferprenin as inhibitor of VKOR activity in the animals exposed to *F. communis* L., K_i values towards ferprenin were determined in liver microsomal fractions from cow, goat, lamb, pig, horse and boar and compared to K_i obtained for rat liver microsomes. Ferprenin inhibited the VKOR activity in a non-competitive manner for all the microsomal fractions we analyzed (data not shown). The K_i values for ferprenin are in Table 1. They were found statistically different between species (K_i determined from horse and boar were excluded of the one way analysis of variance). K_i for ferprenin determined in cow liver microsomes was 3.2-, 6.0-, 2.1-, 1.6- and 9.0-fold higher than that measured in calf goat, lamb, pig and rat liver.

2.5. Determination of the species variability of the VKORC1-inhibiting effect of warfarin

In order to compare the efficiency of ferulenol and ferprenin as inhibitor of VKOR activity to that of warfarin, K_i for warfarin were determined in liver microsomal fractions from cow, goat, lamb, pig, horse and boar. The K_i values are in Table 1. They were found statistically different between species (K_i determined in horse and boar were excluded of the one way analysis of variance).

3. Discussion

Ferulenol and ferprenin are 4-oxygenated coumarin derivatives synthesized by *F. communis* L. Coumarin derivatives are known to be potential inhibitor of vitamin K epoxide reductase activity responsible for the recycling of vitamin K, a cofactor essential for the coagulation process. The presence of ferulenol and/or ferprenin was therefore associated with the toxicity of the 'poisonous' chemotype of *F. communis* L. (Appendino et al., 1988; Fraigui et al., 2001). Indeed, the symptomatology associated with *F. communis* L. poisoning is coherent with an anti-VKORC1 activity of ferulenol and/or ferprenin. Nevertheless, few studies allowing to prove the role of ferulenol and/or ferprenin in 'ferulosis' are available. The involvement of ferulenol in the hemorrhagic syndrome was shown by in vivo studies in rats (Aragno et al., 1988; Fraigui et al., 2001; Fraigui et al., 2002; Lamnaouer et al., 1991; Tagliapietra et al., 1989), mice (Fraigui et al., 2001; Fraigui et al., 2002), sheep (Lamnaouer et al., 1990; Otieno, 1979; Shlosberg and Eged, 1985) and lamb (Egber et al., 1998). Nevertheless, the mechanism was not described, except that consumption of ferulenol was associated to decrease in vitamin K-dependent clotting factors. The unique study demonstrating the in vitro inhibiting effect of ferulenol on VKORC1 was performed in rat (Gebauer, 2007), while inter-species differences might exist, since the replacement of one single amino-acid of VKORC1 can lead to enzyme resistant to coumarin derivatives (Grandemange et al., 2010; Hodroge et al., 2011). The inhibiting effect of ferulenol on VKORC1 of farm animals is still unknown.

In order to determine the underlying mechanism of 'ferulosis', VKOR activity was first analyzed in animal species exposed to *F. communis* L. VKOR activity has been well characterized in rodents because of the intensive use of coumarin derivatives as rodenticides. In rodents, this activity is exclusively catalyzed by VKORC1 in liver, while this activity might be catalyzed by two enzymes, VKORC1 and VKORC1L1, in other tissues. In farm animals, VKOR activity was until now never studied. Liver microsomes from cow, calf, goat, lamb, pig, boar and horse were used to examine VKOR activity by a DTT-driven VKOR assay, as previously described (Hodroge et al., 2011). This experimental method is a direct approach based on the measurement of the VKORC1 reaction product, the vitamin K. By using this method, VKOR activity was detected in liver of all species analyzed in this study. Nevertheless, variations of VKOR activity between species were observed. VKOR

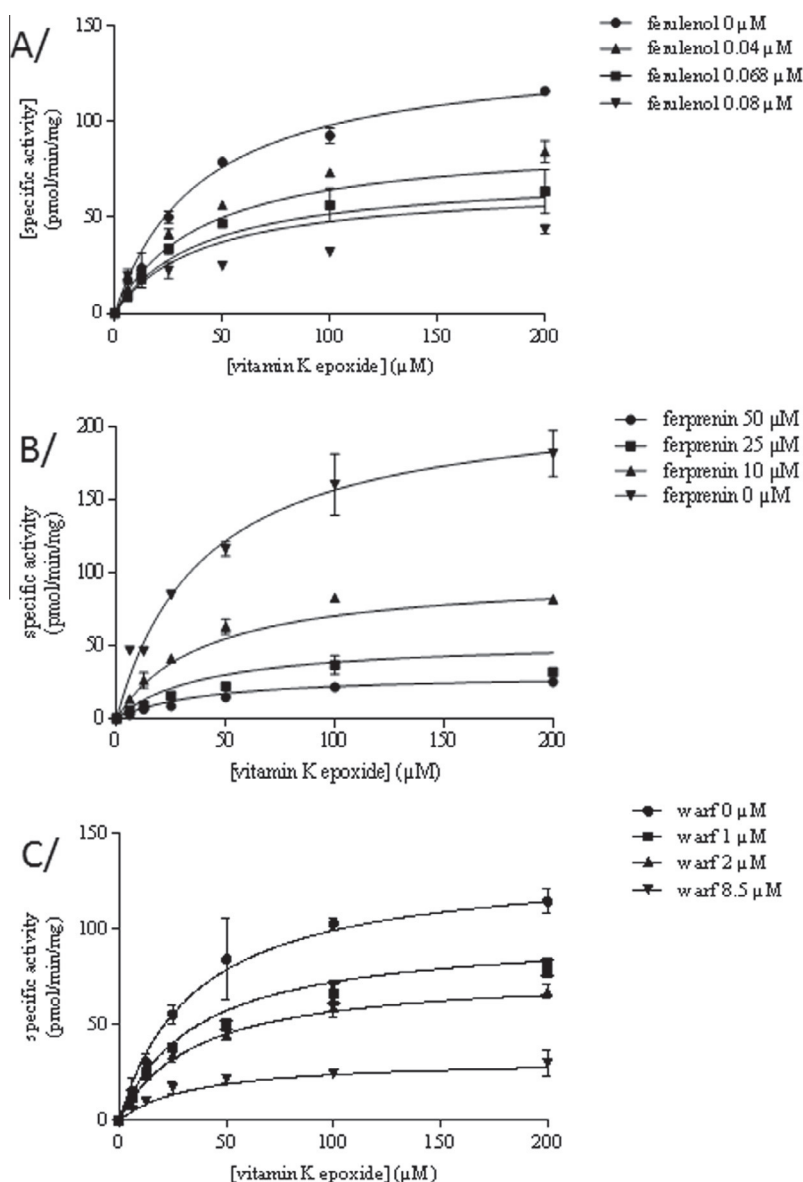


Fig. 3. Plots of vitamin K epoxide reductase activity versus vitamin K > O (6.25–200 μM), in the presence of various concentrations of ferulenol (A) or ferprenin (B) or warfarin (C) incubated with calf liver microsomes.

Table 1
K_i values of ferulenol, ferprenin and warfarin determined in various liver microsomes.

Species	K _i for ferulenol (μM)	K _i for ferprenin (μM)	K _i for warfarin (μM)
Cow	0.13 ± 0.06	16.6 ± 1.2	2.3 ± 0.4
Calf	0.04 ± 0.01	5.2 ± 1.4	2.5 ± 0.1
Goat	0.04 ± 0.02	2.8 ± 1.4	1.6 ± 1.3
Lamb	0.03 ± 0.01	8.0 ± 4.0	0.8 ± 0.2
Pig	0.04 ± 0.01	10.3 ± 1.9	1.2 ± 0.2
Boar	0.08 ± 0.02	3.7 ± 0.6	0.8 ± 0.1
Horse	0.04 ± 0.01	16.3 ± 2.1	1.3 ± 0.3
Rat	0.03 ± 0.01	1.9 ± 0.4	0.5 ± 0.1

activity measured in cattle liver was 1.5- to 2-fold higher than in other species, suggesting inter-species variation in the vitamin K recycling ability. VKOR activity measured in the liver of the different species was efficiently inhibited by warfarin with K_i about 1–2 μM, as observed for rats. The inhibition of VKOR activity by warfarin observed in this study is thus totally coherent with an exclusive involvement of VKORC1 in hepatic VKOR activity of the

different species exposed to *F. communis* L., as described for rats (Hammed et al., 2013).

Since VKOR activity was detected in liver of all animals used in this study, effect of ferulenol and ferprenin on this VKOR activity was analyzed. Ferulenol and ferprenin were found in this study to be able to inhibit VKOR activity in a non-competitive manner, as described for warfarin. The mechanism of inhibition proposed by Silverman (1980) implies the acylation by the 4-oxygenated coumarins of one Cys of the catalytic site of VKORC1 or possibly of a nearby nucleophile amino acid. The proposed mechanism agrees with the irreversible characteristic of the inhibition of the VKOR activity by ferulenol and ferprenin observed in this study.

Ferulenol was already reported to inhibit rat VKORC1, with K_i of 0.098 μM (Gebauer, 2007). In this study, inhibition of rat VKORC1 by ferulenol was highly similar to that previously reported, with a K_i of 0.04 μM. K_i obtained for ferulenol is 10-fold lesser than that obtained for warfarin (Fig. 4). Ferulenol is thus a more potent inhibitor of VKOR activity than warfarin, which is traditionally used in human medicine for patients requiring anticoagulation therapy. K_i

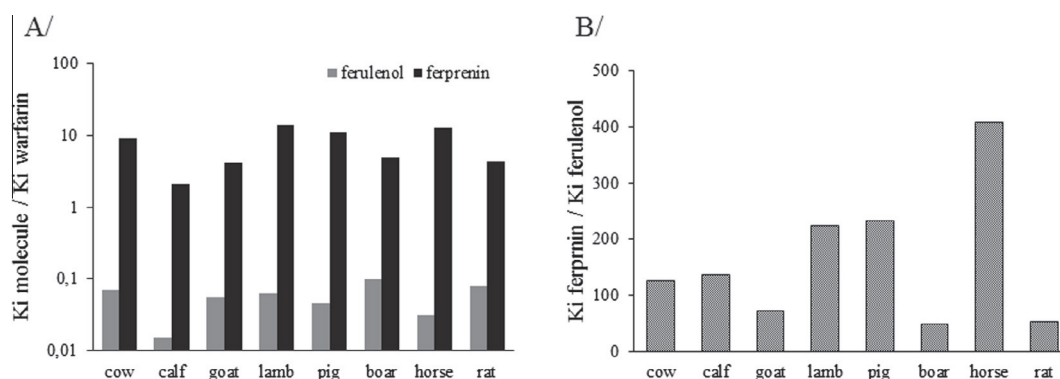


Fig. 4. Comparison of the inhibition effect of warfarin, ferulenol and ferprenin using various liver microsomes. (A) Inhibition effect of ferulenol or ferprenin compared to warfarin, (B) inhibition effect of ferulenol compared to ferprenin.

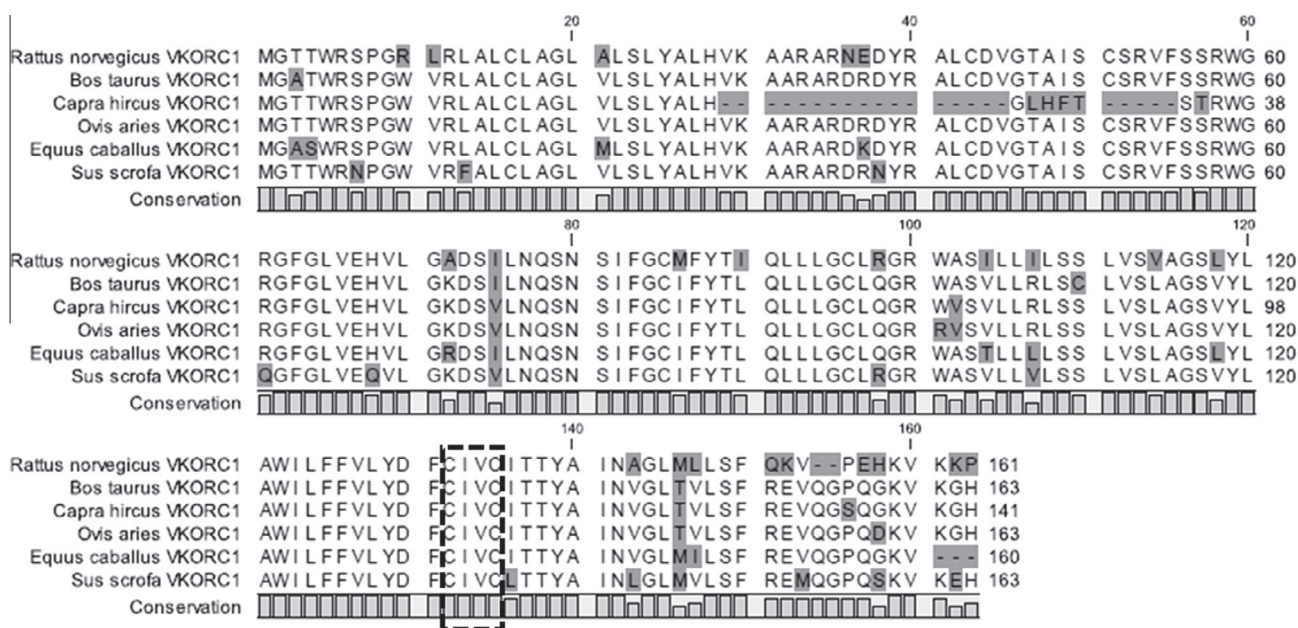


Fig. 5. Multiple sequence alignment of VKORC1 enzymes of animals exposed to *F. communis* L. The active site is indicated by the box.

obtained for ferulenol is similar to those obtained for the most powerful molecules used as rodenticides such as difethialone or brodifacoum (Hodroge et al., 2011). Ferulenol is also able to inhibit VKORC1 of other species, with Ki similar to that obtained for rat, despite the variations of VKORC1 amino acid sequences between species (i.e., identities between VKORC1 amino acid sequences are comprised between 68% and 84%) (Fig. 5). Surprisingly, VKORC1 of cow seems to be more resistant to ferulenol than other VKORC1, while it presents the highest amino acid sequence identity with rat VKORC1. Nevertheless, susceptibility to ferulenol can be qualified to be similar between rat and farm animals. This result is coherent with published studies showing that repeated administration of ferulenol was able to lead to increase in prothrombin time and in reduction of pool of vitamin K-dependent clotting factors (Aragno et al., 1988; Fraigui et al., 2001; Shlosberg and Egyed, 1985; Tagliapietra et al., 1989).

When ferprenin was orally given to rats, Aragno et al. (1988) indicates that this compound clearly increases prothrombin time at very high dosage (a minimum of 30 mg kg⁻¹ for 3 days or 10 mg kg⁻¹ for 5 days). Using DTT-driven VKOR assay, ferprenin was also found to be able to inhibit VKOR activity in liver of all species analyzed in this study. Contrary to ferulenol, this ability to inhibit VKOR activity is very surprising, because a free 4-

hydroxycoumarin moiety was described to be necessary for anti-VKORC1 activity. Nevertheless, Ki obtained for ferprenin were 2–10-fold higher than those obtained for warfarin (Fig. 4) and ferulenol is 100- to 500-fold more potent to inhibit VKOR activity than ferprenin, according to the species (Fig. 4). Ferprenin is thus a very bad inhibitor of VKOR activity for all species analyzed in this study. The direct effect of this molecule remains surprising because the 4-OH moiety of the coumarinic ring appears to be essential for the interaction with VKORC1 enzyme as shown by Gebauer (2007). The hydrolysis of the pyrane cycle of ferprenin is considered by Aragno et al. (1988) as impossible nevertheless it should be interesting to evaluate this possibility either in vivo or even during the microsomal DTT-driven VKOR assay. Contrary to ferulenol, ferprenin seems to be more subject to inter-species variation. Indeed, in rats, Ki obtained for ferprenin is about 1 μM, while in cow Ki is about 15 μM. Therefore, ferprenin could be much more potent to inhibit VKORC1 in rat than in cow. Moreover, demonstration of in vivo effect of ferprenin is only available in rat (Aragno et al., 1988).

4. Conclusions

Ferulenol, and in a lesser extent, ferprenin are thus certainly both responsible for the hemorrhagic syndrome. Nevertheless, *F.*

communis also contain COX-inhibiting polyacetylenes that could synergistically contribute to the poisonous property of the plant (Appendino et al., 1993). Toxicity of ferulenol and ferprenin is also driven by pharmacokinetics and inter-species variations in pharmacokinetics of these compounds. Few studies about pharmacokinetics of these compounds are available. Published results argue for a high metabolic clearance of ferulenol. Indeed, while K_i obtained for ferulenol is lower than that obtained for warfarin, the dosage of ferulenol necessary to lead to an increase in prothrombin time in rat appears to be about 10-fold higher than that used for warfarin (Aragno et al., 1988). The hemorrhagic effect is strictly dependent on the continuous presence of high concentration of VKORC1 inhibitor in the liver. Indeed, few hours without this inhibition will be enough to fully restore the pool of clotting factors. Considering a high metabolic clearance, the toxicity of such compounds will directly depend on the pattern of administration. Frequent repeated dosages are strictly necessary to maintain the inhibiting concentration in the liver. Ruminal administration can be considered as a continuous delivery of ferulenol even if the consumption of *F. communis* L. is not continuous as observed in sheep after oral administration of repeated administration of ferulenol. (Tligui et al., 1994). The detection of ferulenol in 'non-poisonous' chemotypes of *F. communis* L. (Rubiolo et al., 2006) questioned the only responsibility of ferulenol and ferprenin in the hemorrhagic syndrome. Nevertheless, ferulenol and ferprenin are found to be present in far smaller amounts in 'non-poisonous' chemotypes of *F. communis* L. than in 'poisonous' chemotypes. The consumption of these chemotypes does not allow to reach sufficient hepatic concentration leading to complete inhibition of VKOR activity in liver and thus in a stop of the vitamin K-dependent clotting factors activation.

5. Materials and methods

5.1. Animals

Livers from lamb, cow, horse, goat, pig and calf were collected from the slaughterhouse at Saint Romain de Popey (France) under special authorization of the veterinary services and after veterinary health examination. Male OFA-Sprague Dawley rats (200 g) were obtained from a commercial breeder (Charles River, L'Arbresles, France) and acclimated for a minimal period of 5 days. Rat food and water were available ad libitum. The rats were killed by decapitation. The boar was hunted and the liver was removed according to the regulations. All samples were immediately frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Three different animals of each species were sampled excepted in horse and boar where only one sample could be obtained.

5.2. Chemical syntheses

Vitamin K1 (Phylloquinone) was converted into vitamin K10X according to Tishler et al. (1940). Ferulenol was synthesized accordingly to Gebauer (2007). Oxidation of trans,trans-farnesol with PDC afforded farnesal in 87% yield (Hu et al., 2004). Ferprenin was obtained by reaction of 4-hydroxycoumarin with 2 equivalents of trans,trans-farnesal in water at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, in a Knoevenagel/electrocyclization tandem mechanism (Jung et al., 2010) (SI 1).

5.3. Microsomes preparation

Liver microsomes were prepared by differential centrifugations as previously described (Moroni et al., 1995). Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976) using serum albumin as a standard.

5.4. Vitamin K epoxide reductase activity

Microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity was assayed according to a modified protocol previously described by Thijssen (1987), Thijssen and Baars (1989) and Misenheimer and Suttie (1990). Briefly, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mg of total proteins. The reaction was started by the addition of vitamin K > O solution in 1% Triton X-100. After incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, the reaction was stopped by adding 4 mL of iced 1:1 isopropanol/hexane solution. After centrifugation at 5000g for 10 min, the hexane layer was removed and dried under nitrogen. The dry residue was immediately dissolved in 0.2 mL of isopropanol and reaction product was analyzed by UV-HPLC.

5.5. Vitamin K1 measurement

Vitamin K1 was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC chain consisted of an autosampler (Merck AS-2000A), an intelligent pump (Merck L-6200A), a UV-VIS detector (Merck L-4250) and an enregistor (Merck SS420X). Separation was achieved on a C8, 5 μm , $4.6 \times 150\text{ mm}$ analytical column (Sunfire, Irl). The flow rate of the mobile phase (methanol 96%, water 4%, formic acid 1%) was 0.8 mL/min. The column temperature was $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Detection was performed at 248 nm.

5.6. Kinetics

Kinetic parameters (K_m and V_{max}) were obtained from at least two separate experiments after the addition of increasing amounts of vitamin K > O (0.003–0.2 mM) to the standard reaction. The estimation of the kinetic parameters was achieved by the incubation of at least 9 different concentrations of vitamin K > O. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis–Menten model using the curve fitter program of Sigmaplot 9.0™ software.

In order to evaluate the inhibiting effect of various molecules (warfarin, ferulenol and ferprenin) (Fig. 1) on VKOR activity, inhibition parameters (K_i) were determined after addition of various concentrations of molecules to the standard reaction. Inhibition parameters were first assessed with 4 different concentrations (0.01, 1, 10 and 30 μM) and further more precisely determined using concentrations from about 0.05 to $20 \times K_i$. Data were fitted by non-linear regression to the non-competitive inhibition model using Sigmaplot 9.0™ software.

Acknowledgement

This work was supported by Grants ISI no I1301001W "NEORAMUS" from Bpi France.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.012>.

References

- Appendino, G., Tagliapietra, S., Gariboldi, P., Nano, G.M., Picci, V., 1987. Ω -oxygenated prenylated coumarin from *Ferula communis*. *Phytochemistry* 27, 3619–3624.
- Appendino, G., Tagliapietra, S., Nano, G.M., Picci, V., 1988. Ferprenin, a prenylated coumarin from *Ferula communis*. *Phytochemistry* 27, 944–946.
- Appendino, G., Tagliapietra, S., Nano, G.M., Picci, V., 1993. An antiplatelet acetylene from the leaves of *Ferula communis*. *Fitoterapia* 64, 179.

- Appendino, G., Cravotto, G.C., Sterner, O., Ballero, M., 2001. Oxygenated sesquiterpenoids from a non poisonous sardinian chemotype of giant fennel (*Ferula communis*). *J. Nat. Prod.* 64, 393–395.
- Aragno, M., Tagliapietra, S., Nano, G.M., Ugazio, G., 1988. Experimental studies on the toxicity of *Ferula communis* in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 59, 399–402.
- Benkhalti, F., Lamnaouer, D., 1994. Activité anticoagulante de quelques principes isolés de *Ferula communis* L. Actes du 1er colloque international «La pharmacopée Arabo-islamique, Hier et Aujourd'hui», 215–220.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Nature* 227, 248–254.
- Carboni, S., Malaguzi, V., Marsili, A., 1964. Ferulenol, a new coumarin derivative from *Ferula communis*. *Tetrahedron Lett.* 38, 2783–2786.
- Cauwet-Marc, A.M., 1990. Le féruilisme. *Rev. Res. Amélior. Agr. Milieu Aride* 2, 1–7.
- Cauwet-Marc, A.M., 1981a. Le complexe *Ferula communis* L. dans ses populations du sud de la France et de la Corse. *Biol. Ecol. Méditerranéenne* 8, 101–118.
- Cauwet-Marc, A.M., 1981b. Le genre *Ferula communis* L. sur le pourtour du bassin méditerranéen. 106^{ème} congrès des Sociétés savantes. Perpignan 22, 77–87.
- Cornevin, C., 1887. Des plantes vénéneuses et des empoisonnements qu'elles déterminent. Librairie de Firmin-Didot et Cie, Paris, France, pp. 380–396.
- Egber, A., Perevolotsky, A., Yonatan, R., Shlosberg, A., Belaich, M., Landau, S., 1998. Creating aversion to giant fennel (*Ferula communis*) in weaned orphaned lambs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 61, 51–62.
- Fraigui, O., Lamnaouer, D., Faouzi, M.Y., 2001. Acute toxicity of ferulenol, a 4-hydroxycoumarin isolated from *Ferula communis* L. *Vet. Hum. Toxicol.* 44, 5–7.
- Fraigui, O., Lamnaouer, D., Faouzi, M.Y., 2002. Acute toxicity of ferulenol, a 4-hydroxycoumarin isolated from *Ferula communis* L. *Vet. Hum. Tox.* 44, 5–7.
- Gault, G., Riera, M., Berny, P., Benoit, E., Grancher, D., 2015. Giant fennel (*Ferula communis* L.) intoxications in livestock in France. In: Proceedings of the 9th Congress of the International Society of Poisonous plants (ISOPP). Hohhot (PR China), vol. 15, pp. 95–99.
- Gebauer, M., 2007. Synthesis and structure–activity relationships of novel warfarin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2414–2420.
- Grandemange, A., Lasseur, R., Longin-Sauvageon, C., Benoit, E., Berny, P., 2010. Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manage. Sci.* 66, 270–276.
- Hammed, A., Matagrín, B., Spohn, G., Prouillac, C., Benoit, E., Lattard, V., 2013. VKORC1L1, an enzyme rescuing the VKOR activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J. Biol. Chem.* 288, 28733–28742.
- Hodroge, A., Longin-Sauvageon, C., Fourel, I., Benoit, E., Lattard, V., 2011. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch. Biochem. Biophys.* 515, 14–20.
- Hu, H., Harrison, T.J., Wilson, P.D., 2004. A modular and concise total synthesis of (±)-Daurichromenic acid and analogues. *J. Org. Chem.* 69, 3782–3786.
- Infante, M., 1965. Intoxicación por *Ferula communis* L. (intoxicación by *Ferula communis* L.). *Archivos de zootecnia* 14, 25–54.
- Jung, E.J., Park, B.H., Lee, Y.R., 2010. Environmentally benign, one-pot synthesis of pyrans by domino Knoevenagel/6π-electrocyclization in water and application to natural products. *Green Chem.* 12, 2003–2011.
- Lamnaouer, D., Fraigui, O., Abadome, F., 1991. Toxicité et activité anticoagulante de quelques constituants de *Ferula communis* L. chez le rat. *Al Biruniya. Rev. Marocaine Pharm. Rabat.* 7, 135–142.
- Lamnaouer, D., Omari, M., Mounir, A., El-Alouani, M., 1990. Activité anticoagulante de *Ferula communis* L. chez le mouton. *Maghreb Vétérinaire* 5, 5–10.
- Lannehoa, Y., Harry, P., Michau, C., Faretta, A., Merad, R., 1998. Anal bleeding due to hypovitamin K caused by ingesting «fassoukh». *Presse médicale* 31, 1579.
- Li, T., Chang, C.Y., Jin, D.Y., Lin, P.J., Khvorova, A., Stafford, D.W., 2004. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427, 541–544.
- Misenheimer, T.M., Suttie, J.W., 1990. Warfarin resistance in a Chicago strain of rats. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2079–2084.
- Miski, M., Mabry, T., 1985. Daucane esters from *ferula communis* subsp. *communis*. *Phytochemistry* 24, 1735–1741.
- Monti, M., Pinotti, M., Appendino, G., Dallochio, F., Bellini, T., Antognoni, F., Poli, F., Bernardi, F., 2007. Characterization of anti-coagulant properties of prenylated coumarin ferulenol. *Biochem. Biophys. Acta* 1770, 1437–1440.
- Moroni, C., Longin-Sauvageon, C., Benoit, E., 1995. The Flavin-containing monooxygenase in rat liver: evidence for the expression of a second form different from FMO1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 820–826.
- Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C., Watzka, M., 2008. The vitamin K cycle. *Vitamins Hormones* 78, 35–62.
- Otieno, P., 1979. Toxicity of *Ferula communis* in sheep and goats. Annual report of the scientific research division of the Kenya Ministry of Agriculture in 1975, pp. 23–24.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H.J., Lappégard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G., Müller, C.R., Strom, T.M., Oldenburg, J., 2004. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427, 537–541.
- Rubiolo, P., Matteodo, M., Riccio, G., Ballero, M., Christen, P., Fleury-Souverain, S., Veuthey, J.L., Bicchì, C., 2006. Analytical discrimination of poisonous and nonpoisonous chemotypes of giant fennel (*Ferula communis* L.) through their biologically active and volatile fractions. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7556–7563.
- Sacchetti, G., Appendino, G., Ballero, M., Loy, C., Poli, F., 2003. Vittae fluorescence as a tool to differentiate between poisonous and non poisonous populations of giant fennel (*Ferula communis*) of the island Sardinia (Italy). *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 527–534.
- Shlosberg, A., Eged, M.N., 1985. Experimental *Ferula communis* (giant fennel) toxicosis in sheep. *Zentralbl. Veterinärmedizin Reihe A* 32, 778–784.
- Silverman, R.B., 1980. A model for a “molecular mechanism of anticoagulant activity of 3-substituted-4-hydroxycoumarins. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5421–5423.
- Tagliapietra, S., Aragno, M., Ugazio, G., Nano, G.M., 1989. Experimental studies on the toxicity of some compounds isolated from *Ferula communis* in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 66, 333–336.
- Thijssen, H., 1987. Vitamin K epoxide reductase of Scottish resistance genes is not irreversibly blocked by warfarin. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2753–2757.
- Thijssen, H., Baars, L., 1989. Microsomal warfarin binding and vitamin K 2,3-epoxide reductase. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1115–1120.
- Tishler, M., Fieser, L., Wendler, N., 1940. Hydro, oxydo and other derivatives of vitamin K1 related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 2866–2871.
- Tligui, N., Ruth, G.R., Felice, L.J., 1994. Plasma ferulenol concentration and activity of clotting factors in sheep with *Ferula communis* variety *brevifolia* intoxication. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1564–1569.
- Valle, M.G., Appendino, G., Nano, G.M., Picci, V., 1987. Prenylated coumarin and sesquiterpenoids from *Ferula communis*. *Phytochemistry* 26, 253–256.

IV.3.2 Article 6 (soumis): Variabilité des concentrations en féruléol et ferprénine dans les feuilles de grande férule (*Ferula sp.*)

Titre anglais : Variability of ferulenol and ferprenin concentration in French giant fennel (*Ferula sp.*) leaves

IV.3.2.1 Objectif

Le pouvoir inhibiteur des composés de la grande férule ayant une activité anti-vitamine K a été caractérisé précédemment. Le but de cette étude est de déterminer les facteurs influençant la concentration de ces molécules dans la grande férule.

IV.3.2.2 Protocole

Des Férules ont été prélevées à différent moment de l'année et à différents endroits du pourtour méditerranéen. La plus grande partie des férules provient du sud de la France et de la Corse. Les molécules d'intérêt sont extraites, caractérisées et quantifiées. Enfin l'influence de différents facteurs sur la concentration de ces molécules est évaluée.

IV.3.2.3 Principaux résultats

L'analyse des échantillons a permis de mettre en évidence une troisième molécule. En effet, nous avons découvert qu'il y avait deux isomères du féruléol, que nous avons appelés féruléol A et féruléol B. Les différentes férules que nous avons récoltées dans le sud de la France appartenaient à plusieurs variétés et espèces. Ainsi, nous avons identifié deux variétés de *Ferula communis* : *communis* et *microcarpa* ; et une autre espèce la *Ferula glauca*. Les différentes variétés et espèces de férules sont réparties différemment dans le sud de la France et ont des concentrations en AVK différentes. De plus, pour ce qui est de *Ferula communis* var. *communis*, la saison, la nature du sol et l'altitude jouent un rôle important sur sa composition en composés toxiques. Le détail des résultats est présenté dans l'article ci-dessous.

Variability of two tautomers of ferulenol and ferprenin concentration in French giant fennel (*Ferula sp.*) leaves

Gilbert GAULT, Sébastien LEFEBVRE, Claire HASCOET, Marie-Sophie LOUVET,
Khedidja DORANI, Etienne BENOIT, Virginie LATTARD* and Denis GRANCHER

USC 1233 RS2GP, VetAgro Sup, INRA, Univ Lyon, 1 avenue Bourgelat, F-69280, MARCY
L'ETOILE, France

*Corresponding author: Virginie Lattard

USC 1233 INRA-Vetagro Sup 69280 Marcy l'Etoile, France

Email: Virginie.lattard@vetagro-sup.fr; Phone: +33-(0)4 78 87 27 27

ABSTRACT

Few studies have reported quantitative data about the levels of prenylated coumarins in *Ferula* sp. Yet, the toxicity of *Ferula* sp. is only due to the presence of prenylated coumarins and to their concentrations and all studies suggest the existence of several chemotypes within the same species or even within the same variety.

The aim of this study was to investigate the hypothesis of different chemotypes in *french Ferula* sp. in relationship with the botanical genera. In this objective, the species of giant fennels and their concentrations in prenylated coumarins were explored

Three different species or subspecies of giant fennel were detected in continental France: *F. communis communis communis* L., *F. communis catalaunica microcarpa* Cauwet-Marc and *F. glauca* L. Surprisingly, the three species/subspecies of giant fennels were found to be located in exclusive and well separated geographical areas. In French giant fennels, two isomers of ferulenol called ferulenol A and B, and ferprenin were detected. Distribution of ferulenol, ferulenol B and ferprenin were found to be different between botanical varieties, but also according to the season, the soil and the altitude.

Our study seems to suggest that among *F. communis* species, the same plant can be regarded as poisonous at one point and another, as non-poisonous

Keywords : *Ferula communis*, *Ferula glauca*, Distribution, Prenylated coumarins, Ferulenol concentration, Ferprenin concentration,

Abbreviations : VKORC1, Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1; DM, dry matter

1. INTRODUCTION

The genus *Ferula* belongs to the family Apiaceae. This genus contains more than 10 species found from central Asia throughout the mediterranean area to northern Africa (Cauwet Marc, 1981; Infante, 1965, Pimenov, 2004; Kurzlana-Munyk, 2008). They are all robust plants, up to several meters in height, with yellow flowers in bloom in May-July according to the species. In France, presence of three species was observed; *F. arrigonii* Bocchieri, *F. communis* L. and *F. glauca* L (Reduron et al, 2007). (Table 1).

Even if *F. glauca* was initially considered as subspecies of *F. communis*, it is now considered as a different species because of its morphological, anatomical and ecological differences with *F. communis*. *F. glauca* differs from *F. communis* in particular by the morphology of its leaves. In France, *F. glauca* was described to be present only in the Languedoc region (Reduron et al, 2007). This species was reported to be absent in Corsica. Moreover, in France, distribution areas of this species were reported to be different from distribution areas of *F. communis*. *F. glauca* was considered to be not toxic because prenylated coumarin was not detected (Lamnaouer, 1987; Maggi et al, 2009). Nevertheless, only analysis of essential oil of *F. glauca* collected in Pioraco in the center of Italia are available. Extensive analyses are necessary to complete these first phytochemical descriptions.

F. communis is the most widespread species of the genus in France. Among this species, several subspecies and varieties exist, but their characterization and their taxonomy are still not clear. In France, three varieties – i.e., *communis*, *brevifolia* and *microcarpa* Cauwet-Marc, were described (Table 1). This species was shown to be responsible for an hemorrhagic syndrome in livestock (Benzaldi, 1988; Cauwet Marc 1990). This syndrome was called ferulosis. This syndrome is due to the presence of prenylated coumarins (Appendino et al, 1987; Appendino et al, 2001; Fraigui et al, 2001; Miski and Mabry, 1985; Valle et al, 1987;

Rubiolo et al, 2006). – i.e., ferulenol and ferprenin (Appendino et al, 1988, Carboni et al, 1964) in all the parts of the plant (leaf, root, flower, stem). These prenylated coumarins are specific inhibitors of the VKORC1 enzyme of all mammals, even if ferulenol was shown recently to be a better inhibitor of VKORC1 than warfarin (Gebauer, 2007) and ferprenin (Louvet et al, 2015). The VKORC1 enzyme is expressed in the liver of all mammals. This enzyme is responsible for the recycling of vitamin K essential for the activation of clotting factors II, VII, IX and X (Oldenburg et al, 2008). After consumption of *F. communis* containing ferulenol and ferprenin by livestock, the blood clotting is impaired leading to ferulosis (Sholsberg, 1985). This intoxication affected almost all mammals. Even man may be affected after an uncontrolled therapeutic use of *Ferula* extract (Cornevin et al, 1887; Lannehoa et al, 1998). In spite of the wide geographical distribution of *F. communis*, ferulosis appears to be limited to a few areas of the western Mediterranean region, especially Algeria, Marocco, Sardinia, Italia, Spain, Israel (Infante, 1965, Reduron et al, 2007, Shlosberg, 2011). This would be due to the presence of different chemotypes of *F. communis*: the ‘non-poisonous’ chemotype and the ‘poisonous’ chemotype associated to the hemorrhagic syndrome (Benkhalti and Lamnaouer, 1994; Sacchetti et al, 2003). Both chemotypes have been reported to show no morphological differences and to have the same somatic chromosome number ($2n=24$). On the other hand, in ‘non-poisonous’ chemotypes, the main constituents would be daucane esters while in ‘poisonous’ chemotypes, the main constituents would be the prenylated coumarins, even if presence of ferulenol was also described in ‘non-poisonous’ chemotypes (Arnoldi et al, 2004; Rubiolo et al, 2006). The causes of the difference in contents between chemotypes are absolutely not known. In France, *F. communis* was described all along the Mediterranean coast and in Corsica, but the only intoxications of animals were reported in Corsica. The National Centre of Veterinary Toxicology of Lyon (France) diagnosed only 28 clinical cases of giant fennel intoxication in cattle, sheep, pig and

horse from 1990 to 2013 in France (Gault et al, 2013). No information about the chemotype of the French *F. communis* is currently available.

Until now, few studies have reported quantitative data about the levels of prenylated coumarins in *Ferula* sp. Yet, the toxicity of *Ferula* sp. is only due to the presence of prenylated coumarins and to their concentrations. Moreover, for the few studies reporting quantitative results (Sacchetti et al, 2003; Arnoldi et al, 2004; Rubiolo et al, 2006), differences in the analytical methods make interpretation of results difficult. Nevertheless, all studies suggest the existence of several chemotypes within the same species or even within the same variety. The aim of this study was to investigate the hypothesis of different chemotypes in french *Ferula* sp. in relationship with the botanical genera and to produce original data about their ferulenol and ferprenin contents.

2. RESULTS

2.1. Three varieties of *Ferula* were found in France

199 leaves of *Ferula* sp. were collected in France, 172 from continental France and 27 from Corsica. Leaves were identified to belong to different species or subspecies of *Ferula* sp. according to the morphological criteria described in the materials and methods (Table 1). Concerning the samples collected in continental France, 140 leaves were collected from *F. communis communis* (noted *F. communis* in the following), 12 from *F. communis catalaunica microcarpa* (noted *F. microcarpa* in the following) and 20 from *F. glauca*. Concerning the samples collected in Corsica, all the leaves were collected from *F. communis communis*.

In continental France, the geographical repartition of the three varieties of *Ferula* was clearly different. *F. communis* was sampled only between Marseille and Toulon, in the east of the

Rhône River. *F. microcarpa* was found only in the far south of the French Mediterranean coast, close to the Spanish border and *F. glauca* was identified and picked only in the west side of the Rhône river (Figure 1). These areas were exclusive except to the north of our harvest area (in the Rhône valley, 150 km far from the coast) where large scale public works were carried out (highways, high speed railways for example) with mixtures of soil from different origins along the Rhône valley.

The dry matter of the fresh leaves of giant fennel were respectively 18.39 % (SD= 3.28%, N=38) for *F. communis*, 22.76% (SD=2.61%, N=12) for *F. microcarpa* and 23.74% (SD=1.87%, N=20) for *F. glauca*. The dry matter content of *F. communis* was significantly lower than the dry matter of *F. microcarpa* ($p < 0.001$) and *F. glauca* ($p < 0.001$). *F. microcarpa* and *F. glauca* were not significantly different ($p = 0.125$).

2.2. Ferprenin and two tautomers of ferulenol were detected in *Ferula* sp.

In extracts of leaves of *F. communis*, two products with a molecular mass of 367 (i.e., molecular mass of ferulenol in positive mode) were detected by LC/MS with different retention times, one with a retention time of 7.1-7.3 min corresponding to the retention time of the synthesized ferulenol, the second one with a retention time of 8.5-8.7 min. In order to identify the second product, extracts were re-analyzed by HPLC in the same condition with diode array detector. Both products with a molecular mass of 367 presented the same absorption spectrum with two peaks and a maximal absorbance at 258 nm, this spectrum being characteristic of 4-hydroxycoumarin derivatives (data not shown). Moreover, extracts were re-analyzed by liquid chromatography equipped with MS/MS detector. It was then noticed that mass fragments and ratio between quantifier and qualifier ions abundance were the same for each product (data not shown). Therefore, we called these products ferulenol A

and ferulenol B. Results of concentrations of ferulenol A and B determined in leaves of continental French *Ferula sp.* are presented in Figure 3. Ferulenol A was detected in *F. communis* (average = 670 µg/g DM, N=140) and *F. microcarpa* (average = 95.1 µg/g DM, N=12), but was almost undetectable in *F. glauca* (average= 0.6 µg/g DM, N=20). Concentrations of ferulenol A were all significantly different between varieties of *Ferula*. Ferulenol B was detected in all *Ferula sp.* analysed in this study. Its concentration was significantly lower in *F. communis* (average = 12.7 µg/g DM, N=140) than in *F. microcarpa* (average = 58.2 µg/g DM, N=12) or *F. glauca* (average = 53.2 µg/g DM, N=20).

Ferprenin presented a molecular mass of 365 with a retention time of 8.6-8.8 min. It was detected in both *F. communis* (average = 222.3 µg/g DM, N=140) and *F. microcarpa* (average = 70.1 µg/g DM, N=12) but was absent in *F. glauca*. Its concentration was significantly different between *F. communis* and *F. microcarpa*.

2.3. Comparative analysis of ferulenol and ferprenin amounts according to the plant and the geographical area

In continental varieties of giant fennel the levels of ferulenol and ferprenin were widely spread. Figure 4 presents the concentrations of ferulenol A and B and ferprenin per plant. Ferulenol A ranged from 1.19 to 8331 µg/g DM in *F. communis* ; from 13.7 to 849. µg/g DM in *F. microcarpa* ; and from 0.0 to 4.8 µg/g DM in *F. glauca*. Ferulenol B ranged from 0.0 to 53.6 µg/g DM in *F. communis*; from 0.0 to 102.9 µg/g DM in *F. microcarpa*; and from 0.0 to 222 µg/g DM in *F. glauca*. The levels of ferprenin ranged from 0.00 to 1497.35 µg/g DM in *F. communis*; from 0.00 to 274.3 µg/g DM in *F. microcarpa*.

In corsican giant fennel (i.e. *Ferula c.c. communis*) the levels of ferulenol and ferprenin were also widely spread. Table 2 and Figure 3 show the global and detailed results of the Corsican samples comparatively to samples of metropolitan France. In *F. communis* of South Corsica (N=7), ferulenol A ranged from 15.6 to 1495.9 µg/g with a median of 61.5 µg/g DM), ferulenol B was almost absent and ferprenin ranged from 0 to 31.4 µg/g DM. In *F. communis* of North Corsica (N=20), ferulenol A ranged from 0 to 86.7 µg/g with a median of 29.4 µg/g DM, ferulenol B was very low and ranged from 0 to 9.7 µg/g DM with a median of 1.9 µg/g DM, ferprenin ranged from 0 to 414.7 µg/g DM with a median of 49.8 µg/g DM.

Concentrations of ferulenol A and B and ferprenin determined in leaves of French *F. communis* were compared to concentrations of leaves of *F. communis* received from various Mediterranean countries. Analyses confirmed the very broad variation of the levels of ferulenol A, ferulenol B and ferprenin between geographical areas (table 2). Ferulenol A was detected in leaves of *F. communis* picked up in all Mediterranean countries. Nevertheless concentration of ferulenol A was almost 50-fold higher in *F. communis* of Italy and Algeria compared to those of continental France and 10-fold lower in *F. communis* of Portugal and Tunisia. On the other hand, ferulenol B was almost not detected in *F. communis* picked up in Italia, Spain and Algeria and ferprenin was not detected in *F. communis* of Spain and Portugal.

2.4. Impact of season, soil and altitude on ferulenol and ferprenin amounts in *F. communis*

To perform this analysis, only *F. communis* leaf samples in South East of France close to Marseille and Toulon were considered.

Concentrations of ferulenol A and B and ferprenin were evaluated according to the sampling period. Eleven samplings were done in february, 10 in April, 9 in june and 2 in november.

Results are shown in Figure 5. For ferprenin concentrations, no influence of the season was observed. On the contrary, an influence of the sampling period was noticed for ferulenol A and B. Ferulenol A concentrations in *F. communis* were significantly higher in June, while ferulenol B concentration in *F. communis* seemed higher in February and then decreased with the advance of the year.

Concentrations of ferulenol A and B and ferprenin were also analyzed according to the altitude of the sampling and the type of soil. Because of the influence of the season, only samples of *F. communis* done in February in the South East of France were used to perform these analyses. For ferulenol A, only the samples done in June (i.e., corresponding to month with the highest concentration) in the South East of France were used. Results are shown in Figure 6. Altitudes of *F. communis* sampling points were comprised between 0 and 300 meters. Concentrations of ferulenol A and B in the leaves of *F. communis* were not significantly different according to the altitude of the sampling points. They were also not significantly different according to the soil type. On the contrary, concentrations of ferprenin significantly decreased when altitude decreased at least between 0 and 165 meters. Moreover, ferprenin concentration was significantly influenced by the soil type. *F. communis* growing in sand presented the highest concentrations of ferprenin with concentrations 4-fold higher compared to *F. communis* growing in limestone or schist.

3. DISCUSSION

In this study, three different species or subspecies of giant fennel were detected in continental France: *F. communis communis communis* L., *F. communis catalaunica microcarpa* Cauwet-Marc and *F. glauca* L. as described previously in the 1980'. In France, these giant fennels were observed only in the south below a latitude of 45 ° north. Curiously, even if all the giant fennels are found in the South of France, the three species/subspecies of giant fennels are located in exclusive and well separated geographical areas. *F. communis* is present

exclusively in the south East of France and Corsica, *F. microcarpa* in the South West of the Mediterranean coast of France and between the two areas, in the center of the South of France, are present the species *F. glauca*. An influence of the topsoil or the subsoil on that particular distribution may be considered. *F. glauca* were all harvested on jurassic or cretaceous limestone. Except for two *F. microcarpa* harvested on a metamorphic subsoil (chlorite schists), the other *F. microcarpa* were also harvested on jurassic or cretaceous limestone subsoil. Some *F. communis* were also found in areas with limestone subsoil, even if subsoils of geographical areas where *F. communis* are observed are more heterogeneous with subsoils of schist, sand or limestone. Nevertheless, since the three species can grow on limestone, influence of the nature of the subsoil on this surprising distribution seems to be ruled out. Other factors could possibly be considered, topography, average annual sunshine, hydrological features, prevailing winds.... But the results obtained in this study do not allow to explore these hypotheses.

After exploring the species of giant fennels present in France, their toxicity has secondly been explored. Toxicity of *Ferula* was reported to be closely related to its concentration in prenylated coumarins. Indeed, among *F. communis*, two different chemotypes were reported, the “non-poisonous” chemotype containing essentially daucane esters and the “poisonous” chemotype containing essentially prenylated coumarins, the ferulenol, a 4-hydroxycoumarin derivative and the ferprenin, a pyrane (3,2-c) coumarin derivative (Appendino et al, 1987; Appendino et al, 2001; Fraigui et al, 2001; Miski and Mabry, 1985; Valle et al, 1987; Rubiolo et al, 2006). A recent study demonstrated that ferulenol and ferprenin are both effective to inhibit the VKORC1 enzyme (Louvet et al, 2015), thereby preventing the recycling of vitamin K in animals that consumed enough *Ferula sp.* containing one of these molecules. Ability of these molecules to inhibit VKORC1 enzyme are very similar between species, which means that all animals consuming *Ferula* containing one of these molecules in sufficient quantity

could present bleeding disorders. That is why we systematically determined in this study the concentration of ferulenol and ferprenin in leaves of French *Ferula* to better manage the risks associated with the presence of these plants. Results were expressed as μg of active substance per gram of dry matter. The significant differences between levels of dry matter in the leaves of *F. Communis* vs *F. microcarpa* and *F. glauca* confirms the interest of this measurement in the expression of the results of analysis. Moreover drying the samples allows to preserve them a longer time.

Surprisingly, two isomers of ferulenol with the same parent ion and the same fragment ion but with a different retention time were detected in French *Ferula* and were called ferulenol A and B. These isomers could correspond, as previously suggested by De Pascual Teresa et al (1986), to tautomers which are constitutional isomers that readily interconvert with each other. But they can also correspond to configurational E-Z stereoisomers because of the double bonds present in the lateral chain. In the absence of standards, the assignment of each isomer is not possible. Nevertheless, ferulenol A and B could present different physical properties and different biologic properties. Indeed, for anticoagulant molecules used as rodenticide, pharmacokinetic parameters were shown to be different between trans-difenacoum and cis-difenacoum with a cis-difenacoum more persistent in liver compared to trans-difenacoum (Damin-Pernik et al, 2016). Identification of ferulenol A and B seem to be crucial to evaluate their respective importance in the haemorrhagic syndrome associated to the consumption of *Ferula*. Only the biological properties of ferulenol A has now been clearly demonstrated. Indeed, the study by Louvet *et al* (2015) was devoted to the characterization of ferulenol A. Since ferulenol B has so far never been described, no results are currently available. Unfortunately the low concentrations of ferulenol B contained in the leaves of *Ferula*, even those containing the highest concentrations, are hardly compatible with

purification steps which would enable to obtain enough purified ferulenol B to identify this isomer by NMR analysis and to characterize its biological properties.

Interestingly, distribution of ferulenol A and B is different between botanical varieties. Ferulenol A is present in higher quantity than ferulenol B in all French giant fennel species excepted in *F. glauca* in which there is almost only ferulenol B with concentrations lower than 100 µg/g DM. As *F. glauca* is considered as non-toxic (Lamnaouer et al, 1987) and as we never observed confirmed giant fennel poisoning in continental France, we may wonder if both isomers have the same inhibiting effect on the VKORC1 recycling activity. Nevertheless, since the concentration of ferulenol B in *F. glauca* is always very low compared to the concentration of ferulenol A found in *F. communis*, it is thus difficult to conclude in a non-efficiency of ferulenol B *versus* ferulenol A.

Ferprenin was only detected in *F. communis* and *F. microcarpa* with concentrations lower than those of ferulenol. Although ferprenin is also able to inhibit VKORC1, its inhibiting power is significantly lower than that of ferulenol A (Louvet et al, 2015). Thus, the toxicity of French *F. communis* is certainly more associated to the quantities of ferulenol they contain than those of ferprenin unless the quantities of ferulenol and ferprenin differ in the other parts of the plant. It would be therefore interesting to repeat this study to determine concentrations of these molecules in other parts of the plant. Nevertheless, it seems difficult to collect all vegetative parts of the plant, especially the root for the 199 samples of *Ferula* sp. analyzed in this study.

Among the French *ferula*, the species and subspecies that seems to be the most dangerous is *F. communis* growing in the east side of the French Mediterranean coast and in Corsica. Indeed, concentrations of prenylated coumarins found in the leaves of *F. communis* are much higher than those measured in other species/subspecies. This is totally coherent with clinical cases of ‘ferulosis’ observed in France. These clinical cases were only reported in Corsica

where only *F. communis* is growing (except one spot of *F. arrigonii* Bocchieri in the far south of the island). Nevertheless, because concentrations of ferulenol A and ferprenin are much higher in continental *F. communis* compared to Corsican *F. communis*, the continental giant fennel should be more dangerous than the corsican one. The very rarely suspected clinical cases in the continental area of growth of *F. communis* may be related to the very small number of domestic animals in this area and/or an extensive but monitored farming system. On the contrary almost all Corsican domestic animals (horse, cattle, pig) are systematically free ranged with total freedom in spring, summer and autumn.

Surprisingly, concentrations of prenylated coumarins in the leaves of *F. communis* are highly variable between plants with concentrations varying from 1 to 8000 µg/g DM for ferulenol A, from 0 to 50 µg/g DM for ferulenol B and from 0 to 1500 µg/g DM for ferprenin in France. This broad variability in concentrations of prenylated coumarins observed in France is also observed between Mediterranean countries. Our data give evidence of much higher levels of ferulenol in Italian and Algerian *F. communis* compared to France, while in *F. communis* harvested in Portugal and Tunisia, concentrations of ferulenol are very low. These results are consistent with the earlier description of two chemotypes of *F. communis* in Sardinia, the 'poisonous' chemotype and the 'non-poisonous' chemotype. Nevertheless, our study seems to suggest that the same plant can be regarded as poisonous at one point and another, as non-poisonous. Indeed, some factors appear to influence the presence of prenylated coumarins. Indeed, production of prenylated coumarins by *F. communis* could vary according to the season. Our results suggest that production of ferulenol A by the plant may be stronger in June. Indeed, the leaves collected from January to April contained almost no ferulenol A, while those collected in June exhibited very high concentrations of ferulenol A. The concentrations of ferulenol B and ferprenin seem rather decreased from January to June with concentrations in the leaves higher in February than in June. This influence of the season

observed in this study may be related to various factors, the vegetative stage of the plant, precipitation, sunshine, temperature.... Other factors could also influence the amounts of coumarin derivatives present in the leaves of *F. communis*. A negative correlation was found between altitude and concentration of ferprenin. The soil may also have an influence. Indeed, concentrations of ferprenin are much stronger in the leaves of *F. communis* growing in the sands than those growing on limestone or schist. Therefore additional studies seem necessary to identify the influence of these various parameters on the concentrations of prenylated coumarins. Moreover, the presence or absence of ferulenol A/B and/or ferprenin residues in liver of domestic or wild animals suffering from ferulosis should be studied in order to analyze the role of each prenylated coumarin in the syndrome.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Chemical syntheses

Ferulenol was synthesized accordingly to Gebauer et al (2007). Oxidation of trans,trans-farnesol with PDC afforded farnesal in 87% yield (Hu et al, 2004). Ferprenin was obtained by reaction of 4-hydroxycoumarin with 2 equivalents of trans,trans-farnesal in water at 80°C, in a Knoevenagel / electrocyclization tandem mechanism (Jung et al, 2010) (SI 1).

4.2. Plant material

Basal young leaves of 199 samples of *Ferula* sp. were collected in France (Figure 1). 172 samples were picked from different spots along the Mediterranean coast of France, from the Spanish border in the south to the limit of the French Riviera in the east. The Mediterranean coast is divided into two geographical parts by the Rhône River flowing from north to south. Samples were harvested in the north part, other in the South part. Samples were also taken

from the back country of Nîmes and along the Rhône River as far as 150 km from the coast. 27 samples were picked in Corsica (20 from North Corsica and 7 from South Corsica). The sampling spots were chosen in accordance to the information of Cauwet-Marc (1988). Moreover 19 dry samples from different Mediterranean countries were analysed: 7 samples from Algeria, 3 from Tunisia, 3 from Italia, 2 from Spain and 4 from Portugal.

The botanical determination was performed in accordance with the data provided by Cauwet-Marc (1981, 1988) and Reduron (2007). It was based on morphological considerations: size of the plants (*F. communis* being taller and stronger than *F. microcarpa* and *F. glauca*), colour of the leaves (which was full green on each side in both *F. communis* when it was sea green in *F. glauca*), size of the fruits (smaller in *F. microcarpa*) and date of blooming (much earlier in *F. communis* than in *F. microcarpa* and *F. glauca* in same weather conditions). One or two leaves were sampled from one plant at each spot and put into opaque paper bags.

4.3. Plant treatment

In two days after picking all samples were oven dried at 60°C during 24 hours (Jouan-Paris). After drying the dry matter was ground (Tecator-Sweden, particle size : 500 µm) and stored in polypropylene tubes away from natural light. 70 of the 199 samples were precisely dried to measure the dry matter content of the leaves. The foreign samples were dried at room temperature of the respective countries.

4.4. Extraction of ferulenol and ferprenin

Ferulenol and ferprenin were first extracted from the dry samples of giant fennel (Rubiolo et al, 2006). Each dry sample (100 mg of powder) was put into a 50 ml polypropylene tube, added with 4 ml acetonitrile and stirred 30 seconds at 20000 rpm. The supernatant was filtered and poured in a new tube. The dry sample was extracted again with 4 ml acetonitrile, stirred, filtered and separated. A third extraction took place with 2 ml acetonitrile. The three

supernatants were gathered then added with 8 ml hexane and vigorously shaken. The heavy fraction (acetonitrile extract) was separated, stored in a borosilicate tube and evaporated under air flow at 37°C. The dry residue was diluted with 1 ml methanol and stored before measurement of the ferulenol and ferprenin content. The stirring apparatus was cautiously and meticulously cleaned and brushed with acetonitrile and methanol between each extraction. Blanks were prepared according to the same procedure of extraction as the samples.

4.5. Ferulenol and ferprenin analysis by LC-MS

Chromatographic analysis was performed on an Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Chromatographic separation was achieved on XBridge C18 column (4.6 * 150 mm, 5 µm, Waters, Milford, MA, USA) at 48°C with a mobile phase of methanol, 0.1% formic acid (96:4) in isocratic condition. The flow rate was 0.5 mL/min. The injection volume was 20 µL, and the autosampler tray was at ambient temperature. MS detection was carried out by a 6120 Quadripole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) interface and a LCMS Chemstation software from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Detection was by MS with APCI source in positive mode. Nebulizer pressure was set to 60psi, dry gas temperature to 350°C, dry gas flow to 5 L/min, and vaporizer temperature to 400°C. Capillary voltage was set to 4000V, corona needle to 10µA. Identification criteria were the retention time (t_r = 7.1-7.3 min for ferulenol A; 8.5-8.7 min for ferulenol B and 8.6-8.8 min for ferprenin) and the selected ion (367 for ferulenol A and B, and 365 for ferprenin).

4.6. Statisticals analysis

Statistical analysis were performed with R v. 3.1.2. Owing to the distribution of our data, which did not follow a normal distribution, non-parametrical tests were performed. To

compare the different groups, a Kruskal-Wallis test was performed. If it was significant, we used a pot hoc Dunn's test to compare between groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants ISI n°I1301001W "NEORAMUS" from Bpi France.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Distribution of the different species of giant fennel in the south of France

Figure 2 : Influence of Giant fennel species on the level of Ferulenol A and B and Ferprenin in leaves

Figure 3 : Influence of geography location on the level of ferprenin (A), ferulenol A (B) and ferulenol B (C) in leaves of Giant Fennel

Figure 4 : Influence of season on the level of ferprenin, ferulenol A and ferulenol B in leaves of Giant Fennel. To avoid interaction, only samples harvested near Toulon are assessed.

Figure 5 : Influence of altitude and the soil on the level of ferprenin, ferulenol A and ferulenol B in leaves of Giant Fennel. To avoid interaction, only samples which have been harvested near Toulon and in June for ferulenol A, or in February for ferulenol B and ferprenin are assessed.

REFERENCES

Appendino, G., Tagliapietra, S., Gariboldi, P., Nano, G.M., Picci, V., 1987. ω -Oxygenated prenylated coumarin from *Ferula communis*. *Phytochemistry*. 27, 3619-3624.

Appendino, G., Tagliapietra, S., Nano, G.M., Picci, V., 1988. Ferprenin, a prenylated coumarin from *Ferula communis*. *Phytochemistry*. 27, 944-946.

Appendino, G., Cravotto, G.C., Sterner, O., Ballero, M., 2001. Oxygenated sesquiterpenoids from a non poisonous sardinian chemotype of giant fennel (*Ferula communis*). *J. Nat. Prod.* 64, 393-395.

Arnoldi, L., Ballero, M., Fuzzati, N., Maxia, A., Mercalli, E., Pagni, L., 2004. HPLC-DAD-MS identification of bioactive secondary metabolites from *Ferula communis* roots. *Fitoterapia*. 75, 342-354.

Benkhalti, F., Lamnaouer, D., 1994. Activité anticoagulante de quelques principes isolés de *Ferula communis* L. Actes du 1^{er} colloque international « La pharmacopée Arabo-islamique, Hier et Aujourd'hui ». 215-220.

Carboni, S., Malaguzi, V., Marsili, A., 1964. Ferulenol, a new coumarin derivative from *Ferula communis*. *Tetrahedron Lett.* 38, 2783-2786.

Cauwet-Marc, A.M., 1981. Le complexe *Ferula communis* L. dans ses populations du sud de la France et de la Corse. *Biologie Ecologie Méditerranéenne*. 8, 101-118.

Cauwet-Marc, A.M., 1988. Les populations audoises et roussillonaises de *Ferula communis* L. (Apiacées). *Actes del Simposi Internacional de Botanica Pius Font i Quer*, 2: 129-135.

Cauwet-Marc, A.M., 1990. Le férulisme. *Rev. Res. Amélior. Agr. Milieu Aride*. 2, 1-7.

Cornevin, C., 1887. Des plantes vénéneuses et des empoisonnements qu'elles déterminent. Ed. Librairie de Firmin-Didot et Cie, Paris, France. pp 380-396.

Damin-Pernik, M., Espana, B., Besse, S., Fourel, I., Popowycz, F., Caruel, H., Benoit, E., Lattard, V., 2016. Development of an ecofriendly anticoagulant rodenticide based on the stereochemistry of difenacoum. *Drug. Metab. Dispos.* pii: dmd.116.071688

De Pascual Teresa, J., Villaseco, M.A., Hernandez, J.M., Moran, J.R., Urones, J.G., Grande M., 1986. Complex acetylenes from the roots of *Ferula communis*. *Planta Medica*, 458-462.

Fraigui, O., Lamnaouer, D., Faouzi, M.Y., Cherrah, Y., Tijjane, M.. 2001. Acute and chronic toxicity of Fessoukh, the resinous gum of *Ferula communis* L, compared to warfarin. *Vet. Human. Tox.* 43, 327-330.

Gault, G., Riera, M., Berny, P., Benoit, E., Grancher, D., 2015. Giant fennel (*Ferula communis* L.) intoxications in livestock in France. Proceedings of the 9th Congress of the International Society of Poisonous plants (ISOPP). Hohhot (PR China). 15, 95-99.

Gebauer, M., 2007. Synthesis and structure–activity relationships of novel warfarin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2414–2420

Hu, H., Harrison, T.J., Wilson, P.D., 2004. A modular and concise total synthesis of (±)-Daurichromenic acid and analogues. *J. Org. Chem.* 69, 3782-3786.

Infante, M., 1965. Intoxicacion por *Ferula communis* L. (intoxication by *Ferula communis* L.). *Archivos de zootecnia.* 14, 25-54.

Jung, E.J., Park, B.H., Lee, Y. R., 2010. Environmentally benign, one-pot synthesis of pyrans by domino Knoevenagel / 6 π -electrocyclization in water and application to natural products. *Green Chem.* 12, 2003-2011.

Kurzyna-Mlynik, R., Oskolski, A.A., Downie, S.R., Kopacz, R., Wojewo, A., Spalik, K., 2008. Phylogenetic position of the genus *Ferula* (Apiaceae) and its placement in tribe Scandiceae as inferred from nrDNA ITS sequence variation. *Plant Syst Evol.* 274:47–66

Lamnaouer, D., 1987. *Ferula communis* L. : recherches sur la toxicologie et la composition chimique des taxons marocains. PhD Thesis. Université Hassan II-Rabat (Maroc).

Lannehoa, Y., Harry, P., Michau, C., Fareta, A. and Merad, R., 1998. Anal bleeding due to hypovitamin K caused by ingesting « fassoukh ». *Presse médicale*, 31, 1579.

Louvet, M.S., Gault, G., Lefebvre, S., Popowycz, F., Boulven, M., Besse, S., Benoit, E., Lattard, V., Grancher, D., 2015. Comparative inhibitory effect of prenylated coumarins, ferulenol and ferprenin, contained in the 'poisonous chemotype' of *Ferula communis* on mammal liver microsomal VKORC1 activity. *Phytochemistry*. 118, 124-130.

Maggi, F., Lucarini, D., Tirillini, B., Sagratini, G., Papa, E., Vittori, S., 2009. Chemical analysis of the essential oil of *Ferula glauca* L. (Apiaceae) growing in Marche (central Italy). *Biochem. Syst. Ecol.* 7, 432-441.

Miski, M., Mabry, T., 1985. Daucane esters from *ferula communis* subsp. *Communis*. *Phytochemistry*. 24, 1735-1741.

Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C., Watzka, M., 2008. The vitamin K cycle. *Vitam. Horm.* 78, 35-62.

Pimenov, M.G., Leonov, M.V. 2004: The Asian Umbelliferae biodiversity database (ASIUM) with particular reference to South-West Asian Taxa. *Turkish Journal of Botany* 28, 139–145.

Reduron, J.P., 2007. Ombellifères de France. *Bulletin de la Société Botanique du centre ouest*, 3, 1260-1300.

Rubiolo, P., Matteodo, M., Riccio, G., Ballero, M., Christen, P., Fleury-Souverain, S., Veuthey, J.L., Bicchi, C., 2006. Analytical discrimination of poisonous and non-poisonous chemotypes of giant fennel (*Ferula communis* L.) through their biologically active and volatile fractions. *J. Agri Food. Chem.*, 54, 7556-7563.

Sacchetti, G., Appendino, G., Ballero, M., Loy, C., Poli, F., 2003. Vitae fluorescence as a tool to differentiate between poisonous and non poisonous populations of giant fennel (*Ferula communis*) of the island Sardinia (Italy). *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 527–534.

Shlosberg, A., Egyed, M.N., 1985. Experimental *Ferula communis* (giant fennel) Toxicosis in Sheep. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 32, 778–784.

Shlosberg, A. 2011. Plant Toxicoses in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine.* 66, 171-174.

Valle, M.G., Appendino, G., Nano, G.M., Picci, V., 1987. Prenylated coumarin and sesquiterpenoids from *Ferula communis*. *Phytochemistry.* 26, 253–256.

Table 1 : Species, subspecies and varieties of *Ferula* sp. The present varieties in France including Corsica are in bold letters in colored cells.

Genus	Species	Subspecies	Varieties
<i>Ferula</i>	<i>communis</i> L.	<i>communis</i>	<i>communis</i>
		<i>brevifolia</i>	<i>brevifolia</i>
		<i>genuina</i> BURNAT	
		<i>catalaunica</i>	<i>catalaunica</i>
		<i>catalaunica</i>	<i>microcarpa</i> CAUWET-MARC
	<i>glauca</i> L.		
	<i>tingitana</i> L.		
	<i>arrigonii</i> BOCCHIERI		

Table 2 : Levels of ferulenol A and B and ferprenin in Giant fennel leaves of France and other Mediterranean countries. Values are presented as median and numbers in brackets are the first and the third quartile. N is the number of samples. Values in the same column with a same superscript letter are significantly different.

<i>F. communis communis</i> from	N	Ferulenol A ($\mu\text{g/g DM}$)	Ferulenol B ($\mu\text{g/g DM}$)	Ferprenin ($\mu\text{g/g DM}$)
Continental France	140	149.7 (37.9-562.4) ^A	10.4 (0.0-19.4)	181.8 (112.4-271.4) ^{ABC}
Corsica				
from South	7	61.5 (34.9-853.3)	0.0 (0.0-0.0) ^A	0 (0-16.2) ^A
from North	20	29.4 (12.9-44.5) ^{ABC}	1.9 (0.0-4.6)	49.8(25.1-100.1) ^B
Algeria	7	4853 (2461-7133) ^{BDE}	0.0 (0.0-0.0) ^B	75.7 (0.0-174.2)
Italia	3	5765 (3198-6488) ^{CFG}	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-402.4)
Portugal	3	6.5 (1.5-9.3) ^{DF}	82.3 (5.3-120.0) ^{AB}	0.0 (0-0) ^C
Spain	1	138.8	0.0	0.0
Tunisia	3	29.8 (4.5-32.1) ^{EG}	7.1 (0.5-10.9)	52.6 (3.9-76.9)
Kruskal-Wallis P-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001

Figure 1

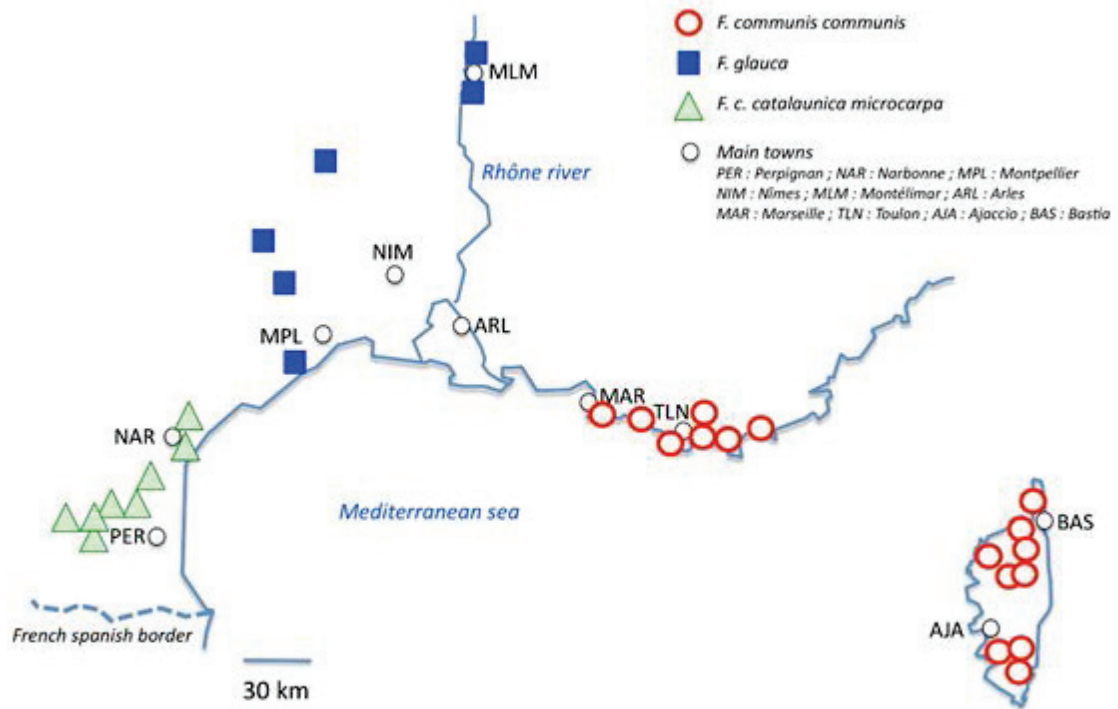


Figure 2

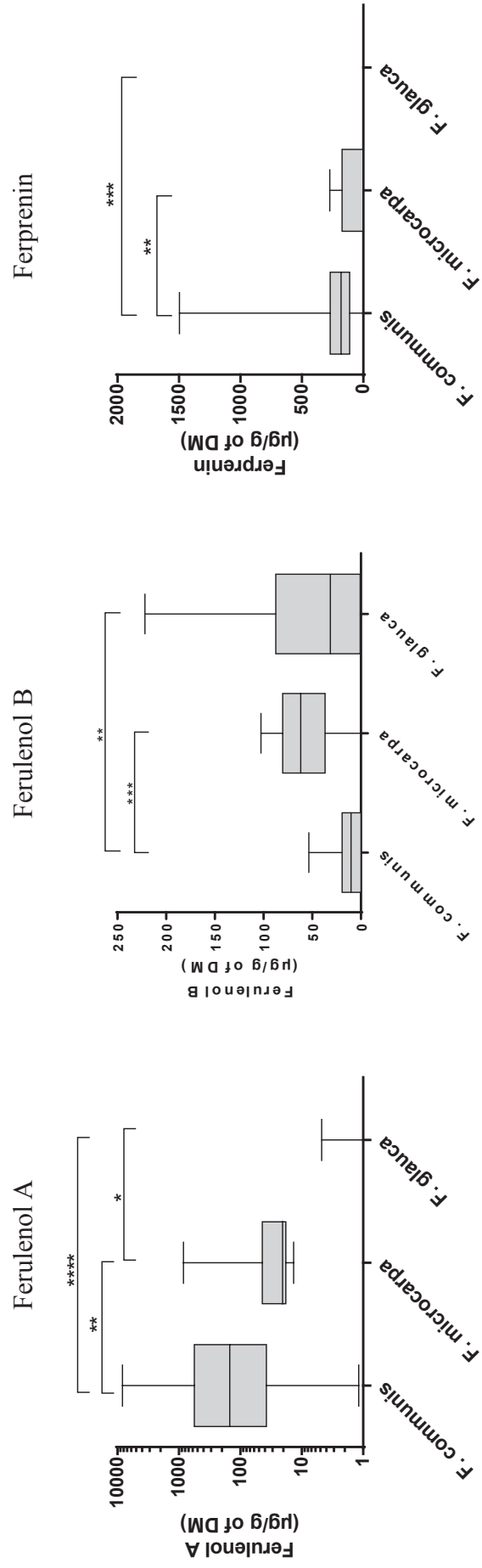


Figure 3

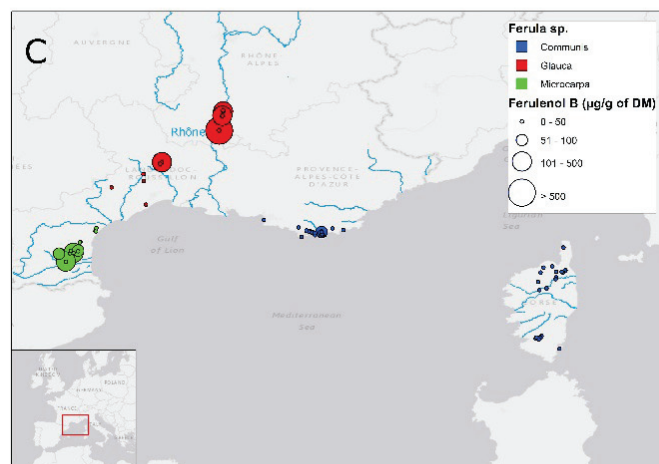
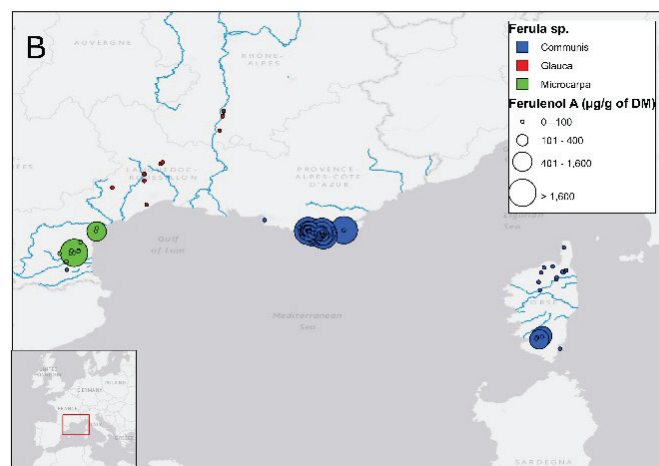
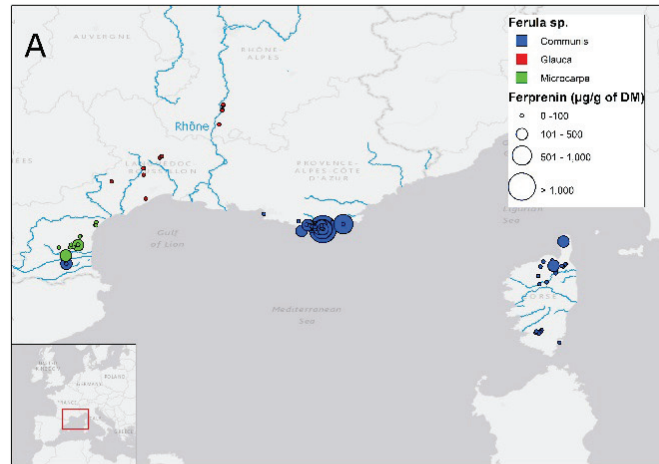


Figure 4

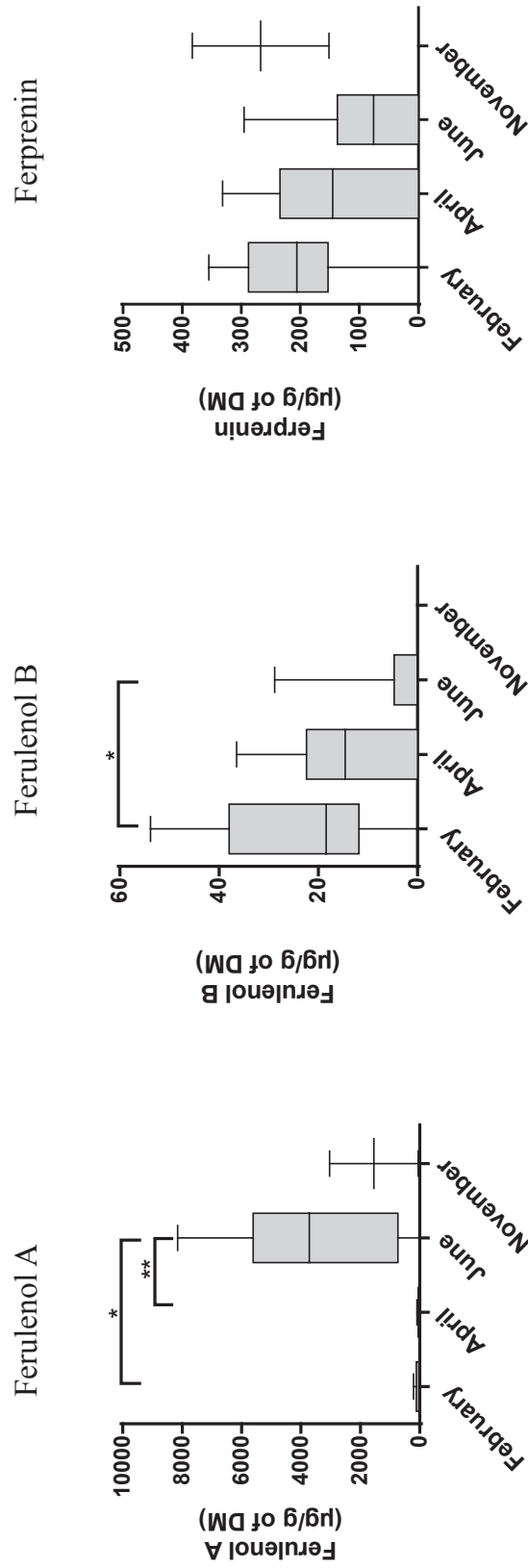
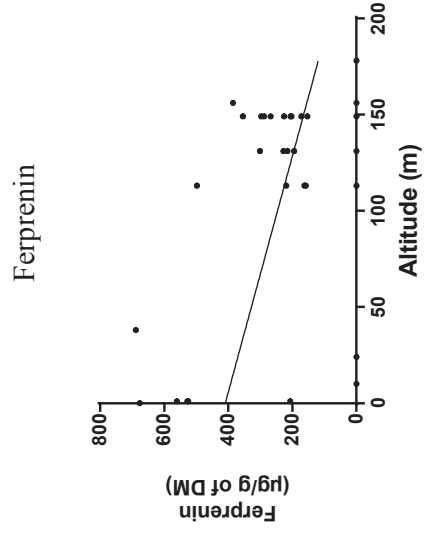
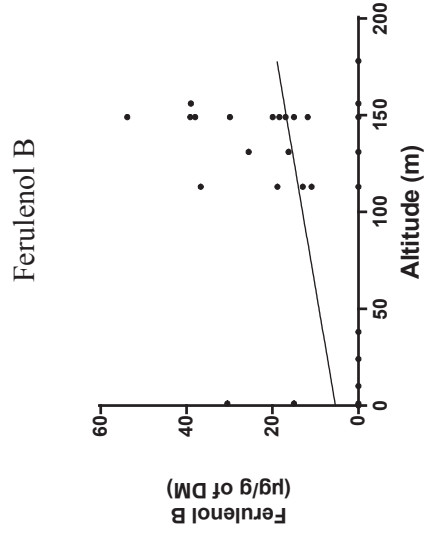
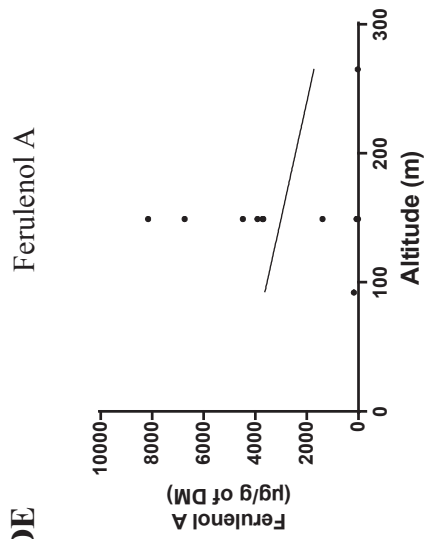
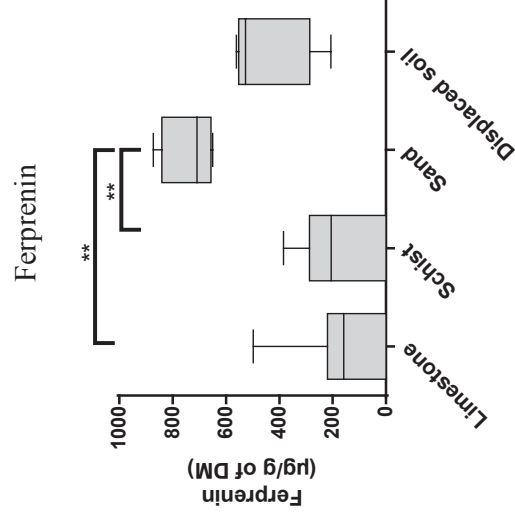
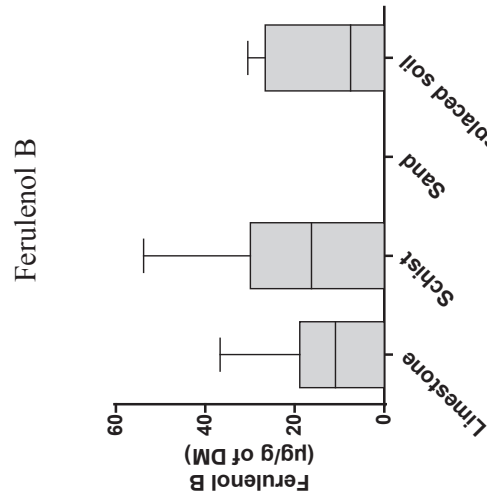
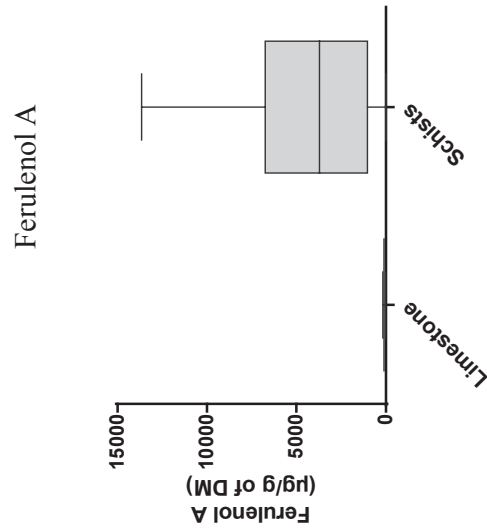


Figure 5

ALTITUDE



SOIL



IV.3.3 Article 7 (soumis): Gestion des populations de rongeurs avec des anticoagulants rodenticides : Vers une troisième génération d'anticoagulants rodenticides

Titre anglais : Management of rodent populations by anticoagulant rodenticides:
Toward third-generation anticoagulant rodenticides

IV.3.3.1 Objectif

Actuellement les molécules rodenticides sont commercialisées sous forme d'un mélange de diastéréoisomères, cependant une étude précédente sur une de ces molécules a montré que les propriétés des isomères étaient sensiblement différentes notamment en ce qui concerne la pharmacocinétique (Damin et al., soumis). L'objectif de cette étude est de déterminer les propriétés des diastéréoisomères de certains AVK dans le but de développer un rodenticide efficace et peu rémanent.

IV.3.3.2 Protocole

La pharmacocinétique et l'efficacité des diastéréoisomères de la bromadiolone, du difénacoum, de la diféthialone, du brodifacoum et du flocoumafène sont étudiées sur des rats Sprague Dawley de 8 semaines. En plus de l'étude *in vivo*, la capacité de ces molécules à inhiber l'activité de l'enzyme VKORC1 est étudiée *in vitro*.

IV.3.3.3 Principaux résultats

Cette étude confirme que les pharmacocinétiques diffèrent entre les diastéréoisomères d'une même molécule. À l'aide de ces informations et des constantes d'inhibitions, nous avons pu créer un diagramme (figure 20). Celui-ci pourrait être une base à la réflexion sur l'opportunité d'une nouvelle génération d'AVK moins rémanente constituée de certains diastéréoisomères des AVK de seconde génération.

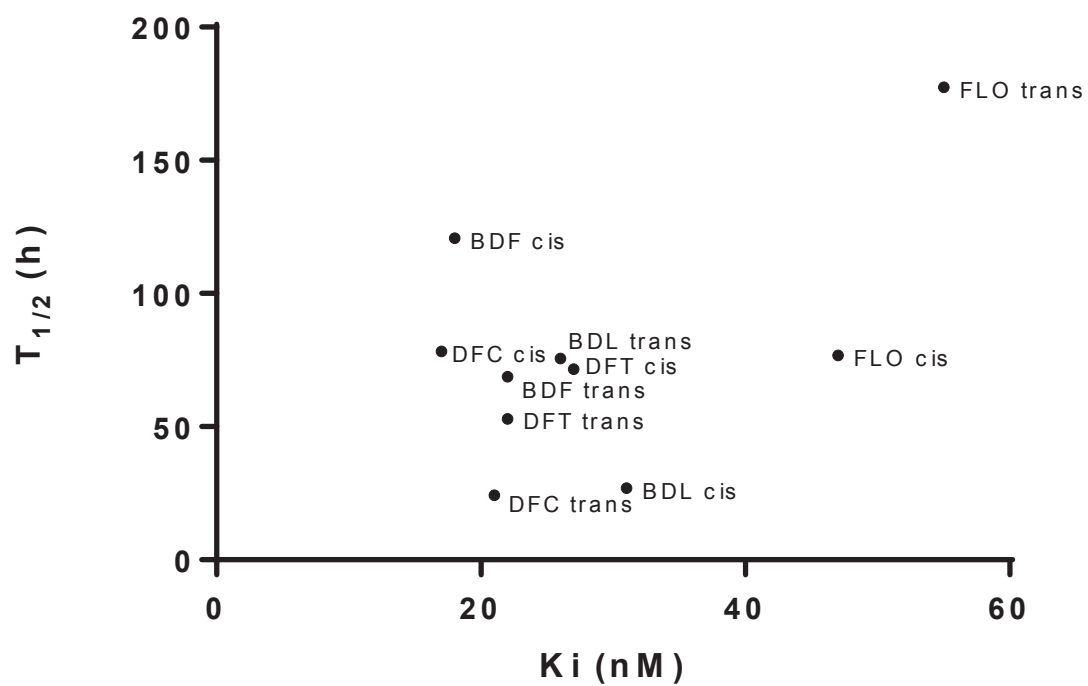


Figure 17 : Diagramme donnant pour chacun des diastéréoisomères de chacune des molécules sa constante d'inhibition sur microsomes de foie de rats sensibles en abscisse et en ordonnée son temps de demivie. BDL : bromadiolone, DFC : difénacoum, DFT : diféthialone, BDF : brodifacoum et FLO : flocoumafène.

Management of rodent populations by anticoagulant rodenticides: Toward third-generation anticoagulant rodenticides

MARLÈNE DAMIN-PERNIK, BERNADETTE ESPANA, SEBASTIEN LEFEBVRE, ISABELLE FOUREL, HERVÉ CARUEL, ETIENNE BENOIT, VIRGINIE LATTARD

USC 1233 RS2GP, Univ Lyon, VetAgro Sup, INRA, , F-69280, MARCY L'ETOILE, France
(M.D.P, B.E, S.L, I.F, E.B, V.L)

Liphatech, Bonnel, 47480 Pont du Casse, France (M.D.P, H.C)

Running Title : Toward third-generation anticoagulant rodenticides

*Corresponding author: Virginie Lattard

USC 1233 INRA-VetAgro Sup 69280 Marcy l'Etoile, France

Email: Virginie.lattard@vetagro-sup.fr; Phone: +33(0)4 78 87 27 27; Fax: +33(0)4 78 87 05

16

The number of text pages: 26

Number of tables: 3

Number of figures: 7

Number of references: 36

Number of words in the

- Abstract: 200
- Introduction: 858
- Discussion: 1163

List of nonstandard abbreviations:

AR, anticoagulant rodenticides

FGAR, first-generation anticoagulant rodenticides

SGAR, second-generation anticoagulant rodenticides

LOQ, limit of quantification

VKORC1, vitamin K epoxide reductase enzyme

ABSTRACT

Second-generation anticoagulant rodenticides (SGARs) have been used since the 1980s for pest management. They are highly efficient even in warfarin-resistant rodents. Nevertheless, because of their tissue persistence, non-target poisoning by SGARs is commonly described in wildlife. Due to this major problem, a new generation of anticoagulants must be developed to limit this risk. This study proposes a method of developing a new generation of anticoagulant rodenticides by re-visiting the old SGARs based on the concept of stereochemistry. Each current SGAR is a mixture of diastereomers. Diastereomers of each compound were purified, and their biological properties were compared by determining their ability to inhibit vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity involved in the activation of vitamin K-dependent clotting factors and their toxicokinetic properties. Systematically, for each SGAR, both diastereomers are as effective in inhibiting VKOR activity. However, their toxicokinetic properties are very different, with one of the two diastereomers always more rapidly cleared than the other one. For all SGARs except flocoumafen, the less persistent diastereomer is always the less predominant isomer present in the current mixture. Therefore, the development of baits containing only the less persistent diastereomer would avoid the ecotoxicological risk associated with their use without decreasing their efficacy.

INTRODUCTION

Managing populations of commensal rodents is essential. By sharing our environment, they can transmit to humans, directly or indirectly, more than 40 zoonotic pathogens, such as *Yersinia pestis*, Hantavirus, and *Leptospirosis* sp. (Buckle and Smith 2015). They can cause the destruction or degradation of cereals, accounting for nearly 10% of the grain crops in the world, with considerable variation depending on the country (Buckle and Smith 2015) (Battersby 2004). Rodents also damage substructures and electronic networks.

The management of rodent populations should be based on sanitary and architectural approaches. However, these approaches are often widely associated with the use of rodenticides. The sophisticated social organization of the populations of rats and neophobic behavior of these animals make the action of toxicity with an immediate effect completely ineffective. The only really effective molecules that can be used to manage such populations are anticoagulant rodenticides (ARs). Their delayed action, with mortality occurring several days after consumption, makes them effective in controlling neophobic species. Indeed, ARs, by inhibiting the VKORC1-dependent vitamin K epoxide reductase activity, lead to the progressive reduction of the pool of vitamin K necessary for the activation of clotting factors II, VII, IX, and X (Suttie 1985; Furie and Furie 1988). Therefore, prolonged or repeated exposure to ARs leads to rodent death by hemorrhage within 3 to 7 days. ARs are usually classified into two generations. The first generation of ARs includes diphacinone, warfarin, coumatetralyl, and chlorphacinone. The second generation of ARs includes bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen, and difethialone. All ARs are 4-hydroxycoumarin derivatives except chlorphacinone, which is a derivative of indane-1,3-dione (Hadler and Buckle 1992).

First-generation ARs (FGARs) generally require several days to cause rodent death. The activity of these FGARs is now largely limited by the genetic resistance phenomenon. This

resistance was observed soon after the beginning of the use of warfarin in the 1950s. The first case of resistance to FGARs in brown rats was observed in 1958 in the United Kingdom (Boyle 1960). In the following years, resistance was reported everywhere in rats and mice in Europe (Dodsworth 1961), the United States (Jackson and Kaukeinen 1972), Canada (Siddiq and Blaine 1982), Australia (Saunders 1978), and Japan. The most common resistance mechanism is a result of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *Vkorc1* gene, leading to an enzyme that is less sensitive to the action of ARs (Li et al. 2004; Rost et al. 2004). The frequencies of these SNPs in populations of rats and mice are very high, reaching 100% depending on the region, making the use of FGARs often ineffective.

The development of second-generation ARs (SGARs) resulted from the emergence of resistance to FGARs in rodent populations. SGARs have been registered from 1975 to 1984, with difenacoum being used first, followed by brodifacoum, bromadiolone, difethialone, and flocoumafen. They are more potent and active after only one feeding due to their longer half-life (Vandenbroucke et al. 2008). Nevertheless, due to their increased tissue persistency, non-target poisoning by SGARs is commonly described in wildlife. Different species are affected by this exposition, such as stoats (*Mustela hermina*), weasels (*Mustela nivalis*) (Elmeros et al. 2011), red foxes (*Vulpes vulpes*) (Sage et al. 2010; Geduhn et al. 2015), European minks (*Mustela lutreola*) (Fournier-Chambrillon et al. 2004), bobcats (*Lynx rufus*) (Serieys et al. 2015), various raptors such as red kite (*Milvus milvus*), buzzards (*Buteo buteo*), kestrels (*Falco tinnunculus*), peregrine falcons (*Falco peregrinus*), and eagle owls (*Bubo bubo*) (Thomas et al. 2011; Christensen et al. 2012; Hughes et al. 2013; Langford et al. 2013; Ruiz-Suárez et al. 2014). The residues of SGARs have been detected in the liver as well as in the whole carcass of birds and mammals. In 2013, the UK Predatory Bird Monitoring Scheme reported the presence of SGARs in barn owls (84% of 58 birds analyzed), red kites (94% of 18 birds analyzed), and kestrels (100% of 20 birds analyzed). ARs were thus identified by the

European Union as candidates for future comparative risk assessment and substitution. However, in the absence of an alternative, AR molecules were included in Annex 1 of the EU Biocidal Products Directive 98/8/EC, and their use is still tolerated until a more appropriate solution is found.

This study proposes a method of developing a new generation of ARs by improving the old SGARs based on the concept of stereochemistry. A previous study performed by Damin et al. demonstrated that difenacoum, the first developed SGAR, is a mixture of two diastereomeric forms, namely, 43% of the composition is trans-isomers, with a short half-life and 57% of the composition is cis-isomers, with a long half-life. The production of a new difenacoum containing exclusively trans-isomers could significantly reduce its tissue persistency and thus avoid secondary poisoning associated with its use. This method of producing an ecofriendly difenacoum may be applicable to all SGARs. Indeed, all SGARs have two asymmetric carbons (Kelly et al. 1993; Buckle and Smith 2015). Therefore, all SGARs are a mixture of two diastereomeric forms that could have different biological properties. This study aimed to explore the differences in the biological properties of the diastereomers of SGARs and to propose the best diastereomer of each SGAR mixture to use as a rodenticide.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Bromadiolone (3-[3-[4-(4-bromophenyl)phenyl]-3-hydroxy-1-phenylpropyl]-4-hydroxychromen-2-one) and difethialone (3-[3-[4-(4-bromophenyl)phenyl]-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl]-2-hydroxythiochromen-4-one) were supplied by Liphatech (Agen, France). Difenacoum (2-hydroxy-3-[3-(4-phenylphenyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl]chromen-4-one), brodifacoum (3-[3-[4-(4-bromophenyl)phenyl]-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl]-4-hydroxychromen-2-one), and flocoumafen (4-hydroxy-3-[3-[4-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methoxy]phenyl]-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl]chromen-2-one) were purchased from Hangzhou Ich Biofarm Co. (China).

(1R,3R)(1S,3S)-isomers (called trans-isomers) and (1R,3S)(1S,3R)-isomers (called cis-isomers) of difenacoum, difethialone, flocoumafen, and brodifacoum were separated and purified in a silica gel column in our laboratory. (1R,3S)(1S,3R)-isomers (called trans-isomers) and (1R,3R)(1S,3S)-isomers (called cis-isomers) of bromadiolone were also separated and purified in a silica gel column in our laboratory. Dimethyl sulfoxide (DMSO), acetonitrile, methanol, acetone, diethyl ether, hexane, and orthophosphoric acid were obtained from VWR International (Fontenay sous bois, France), and Vetflurane[®] and vitamin K1 were obtained from Alcyon (Miribel, France). Vitamin K1 was converted to vitamin K epoxide according to the method described by Tishler et al. (1940). Purity was estimated by LC/MS and was higher than 99%. High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade water, which was prepared using a milli-Q plus system (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France), was used for the preparation of the HPLC eluents.

Animals

Eight-week-old male OFA Sprague-Dawley rats (each weighing 175-200 g) were obtained from a commercial breeder (Charles Rivers, l'Arbresle, France) and were acclimated for a minimum period of 5 days. The rats were housed four per cage under a constant photoperiod and ambient temperature. The animals were kept in standard cages (Eurostandard, Type IV, Tecniplast, Limonest, France) and received standard feed (Scientific Animal Food and Engineering, reference A04) and water *ad libitum*. Experimental research on the rats was performed according to an experimental protocol following international guidelines and with approval from the ethics committee of the Veterinary School of Lyon.

Pharmacokinetic study

Male OFA Sprague-Dawley rats received, by *per os* administration, cis- or trans-isomers of difenacoum, bromadiolone, flocoumafen, brodifacoum, and difethialone. Anticoagulants were dissolved in 10% DMSO and 90% vegetable oil and were administered by force feeding. The animals were given a daily subcutaneous injection of vitamin K1 (5 mg/kg). Finally, the rats were anesthetized with Vetflurane[®]. Blood samples were obtained via terminal blood collection by cardiac puncture in citrated tubes. The rats were euthanized with CO₂, and the livers were then collected and stored at -20°C until analysis.

No-choice feeding test with cis- or trans-isomers of bromadiolone and difethialone

Before testing, all of the animals were maintained on diet A04 (Scientific Animal Food and Engineering) and water *ad libitum*. Individuals were weighed before the start of the test. No-choice feeding tests were performed on groups of 10 rats. The rats were fed bait containing 0.005% cis- or trans-isomers of bromadiolone or 0.0015% cis- or trans-isomers of difethialone. Cis- and trans-isomers of bromadiolone and of difethialone are pure at 93, 98,

99, and 94%, respectively (the remaining part is the other stereoisomer). Feeding periods of 4 days were used. The contents of food pots were weighed daily, and the intake of bait was recorded. The mortality of rats was also observed daily. At the end of the feeding period with toxic baits, the animals were given diet A04 again and were observed for an additional period of 17 days.

Determination of AR concentration in the liver

Liver tissue (1 g) was extracted with acetone using an Ultra Turrax tissue disperser from IKA Labortechnik[®] (VWR International, Strasbourg, France). The extract was centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the supernatant was evaporated at 60°C under a gentle nitrogen flow. Dry extract was resuspended in acetonitrile/hexane (50%/50%). The hexane layer was eliminated, and the remainder was dried at 60°C under a gentle nitrogen flow. The final dry extract was dissolved in methanol, and the AR concentrations were analyzed by HPLC on a reverse phase C-18 column (4.6×150 mm, 5 µm; Waters, Milford, MA, USA) at detection wavelengths of 258, 260, 265, 267, and 272 nm for difenacoum, difethialone, bromadiolone, brodifacoum, and flocoumafen, respectively. The C-18 column was heated at 40°C for difenacoum, bromadiolone, flocoumafen, and brodifacoum and at 30°C for difethialone. A gradient elution system was used with a flow rate of 1 mL/min as follows: from 30% methanol/70% water (acidified with 0.2% H₃PO₄) to 70% methanol/30% water at 10 min for difenacoum; from 30% acetonitrile/70% water (acidified with 0.1% H₃PO₄) to 90 acetonitrile/10% water at 14 min for brodifacoum; from 60% methanol/40% water (acidified with 0.2% H₃PO₄) to 80% methanol/20% water at 20 min for bromadiolone; from 60% methanol/40% water (acidified with 0.2% H₃PO₄) to 90% methanol/10% water at 22 min for flocoumafen; and from 60% acetonitrile/40% water (acidified with 0.2% H₃PO₄) to 75% acetonitrile/25% water at 10 min for difethialone.

VKOR activity assay and kinetics

Liver microsomes were prepared from fresh livers by differential centrifugation according to the protocol described by Hodroge et al. (2011). Microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity was assayed according to the protocol described by Hodroge et al. (2011, 2012). The inhibiting effect of the silica gel column-purified cis- or trans-isomers of ARs was evaluated by the determination of K_i after the addition of various concentrations of the anticoagulant to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vitamin K epoxide (from 0.001 to 0.2 mM) using anticoagulant concentrations from approximately 0.05 to $20 \times K_i$.

Data analysis

Pharmacokinetic calculations were performed using the noncompartmental approach on the mean results per group. The elimination half-life ($t_{1/2(el)}$) was calculated using linear regression in GraphPad Prism 6 software (California, USA). The total area under the curve (AUC) was calculated using the linear trapezoidal method and adding the estimated terminal portion of the curve ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$). Statistical analysis of pharmacokinetic parameters were done using GraphPad Prism 6 software (CA, USA). A Mann-Whitney test was used with $\alpha < 0.05$ in order to compare statistically the results between the two groups.

For kinetic analysis of the VKOR activity, data were fitted by non-linear regression to the non-competitive or competitive inhibition model using GraphPad Prism 6. The choice of the best model was based on the *Corrected Akaike Information Criterion*.

RESULTS

Separation of the diastereoisomers of SGARs

The analysis of SGARs by HPLC on a C18 reverse phase column as described in the experimental procedure showed, for each compound, two different peaks corresponding to the cis- and trans-diastereomer forms (Fig. 1). The structures of the cis- and trans-isomers of flocoumafen, difethialone, brodifacoum, bromadiolone, and difenacoum are shown in Figs. 2A, 3A, 4A, 5A, and 6A, respectively. The cis- and trans-isomers are shown in only one alternative orientation of substituents. Both peaks of each compound presented the same absorption spectrum, with maximum absorbances at 258, 265, 272, 267, and 260 nm for difenacoum, bromadiolone, flocoumafen, brodifacoum, and difethialone, respectively. The retention times, respectively, were 11.3 and 12.5 min for the cis- and trans-isomers of difenacoum, 15.0 and 16.2 min for the cis- and trans-isomers of brodifacoum, 20.1 and 20.7 min for the cis- and trans-isomers of flocoumafen, 17.1 and 17.9 min for the cis- and trans-isomers of bromadiolone, and 20.2 and 21.3 min for the cis- and trans-isomers of difethialone (Fig. 1).

Comparative analysis of the tissue persistence of the trans- and cis- isomers of the five SGARs in the liver

To study the hepatic persistence of the trans- and cis-isomers of SGARs, male OFA Sprague-Dawley rats were divided into groups of 4 rats that received, by *per os* administration, 3.0 mg.kg⁻¹ of trans- or cis-isomers of flocoumafen, difethialone, brodifacoum, bromadiolone, or difenacoum. The rats were killed 24, 72, 168, 336, or 504 hours after the administration, and the concentrations of the trans- and cis-isomers of SGARs were determined in the liver for each rat. The time-dependent evolution of the cis- and trans-isomers in the liver is presented

in Fig. 2B for flocoumafen, Fig. 3B for difethialone, Fig. 4B for brodifacoum, Fig. 5B for bromadiolone, and Fig. 6B for difenacoum.

The profile of elimination was the same for the 5 molecules studied; specifically, one isomer was eliminated more quickly than the other, and the decrease followed a clear biphasic profile. For difenacoum, difethialone, and brodifacoum, the cis-isomer was eliminated less rapidly than the trans-isomer. However, for bromadiolone and flocoumafen, the cis-isomer is eliminated more quickly. The half-lives and areas under the curve (AUCs) of the trans- and cis-isomers in the liver were calculated using a linear regression model and are presented in Table 1.

Analysis of the inhibiting effect of the trans- and cis-isomers of SGARs on vitamin K epoxide reductase activity

The ability of the cis- and trans-isomers of each SGAR to inhibit the VKOR activity catalyzed by warfarin-susceptible rat liver microsomes was evaluated by determining K_i constants. The results are presented in Table 2. The cis- and trans-isomers of each SGAR were all able to inhibit VKOR activity. For each SGAR, the K_i constants were similar between the diastereomers.

No-choice feeding test with the cis- or trans-isomers of bromadiolone or difethialone

A no-choice feeding test was performed with bait containing mainly one isomer of bromadiolone or difethialone at the concentrations of 50 and 15 ppm for bromadiolone and difethialone, respectively (Table 3). The baits were composed of 93% cis-isomers with 7% trans-isomers or 2% cis-isomers with 98% trans-isomers for bromadiolone and 6% cis-isomers with 94% trans-isomers or 99% cis-isomers with 1% trans-isomers for difethialone. The daily consumption of baits was similar for the first 3 days between treatments, with an important decrease on day four. A 100% mortality rate was observed for all of the baits used.

Regardless of the bait used, the rats died in an average of 5 days, with mortality observed between days 3 and 9. The concentrations of the AR residues were determined after the death of the rats. The residues of bromadiolone in the liver following the death of the rats were 4-fold reduced using the bait containing principally the cis-isomers compared with the bait containing the trans-isomers of bromadiolone. The residues of difethialone in the liver were only 1.5-fold reduced using the trans-isomers compared with the cis-isomers.

DISCUSSION

ARs are crucial for controlling rodent populations. Indeed, trapping can be effective if there is a low density of rodents; however, in the presence of a large population, trapping is time-consuming and ineffective (Buckle and Smith 2015). Efficient repellents/attractants and ultrasound seem limited because of the habituation of rodents (Berny et al. 2014). Other chemical products (alphachloralose, cholecalciferol, zinc phosphide, and bromethalin) present major drawbacks, making their use or their approval difficult (RRAC 2015). Nevertheless, despite the importance of ARs in the management of rodent populations, their use must take into account different issues: the resistance problem associated with the use of FGARs (Hadler and Buckle 1992; Rost et al. 2009) and the secondary poisoning of wildlife essentially associated with the use of SGARs (Rattner et al. 2014). Therefore, third-generation ARs are urgently needed. The stereochemistry-based solution proposed recently to produce a new and eco-friendly difenacoum (Damin et al. 2016) seems to be a method of rapidly generating this third-generation of ARs at a reduced cost. Indeed, the 5 commercially available SGARs are a mixture of diastereomeric forms (Hunter et al. 1988; Huckle et al. 1988; Kelly et al. 1993; European Parliament 2007; Cort et al. 2012), which are generally easy to separate and purify. To rapidly generate the TGARs, it is necessary to revisit the SGARs to identify the diastereomer of each SGAR with the smallest half-life and increase its amount in each mixture.

The data found in the scientific literature, in the regulatory documents, allowed the systematic identification of the major and minor diastereomers in the commercial preparation of each SGAR. Flocoumafen, difenacoum, and brodifacoum are a mixture of 50 to 80% cis-isomers and 20 to 50% trans-isomers (Swaine 1985; Kelly et al. 1993; European Parliament 2009; Damin et al. 2016); bromadiolone is a mixture of more than 70 of trans-isomers and less than

30% of cis-isomers; and difethialone is a mixture of more than 70 of cis-isomers and less than 30% of trans-isomers.

The original reasons for the development of SGARs with such ratios between diastereomers have never been mentioned previously in the literature. At the time of development, we supposed that SGARs were developed to cause rodent death after a single ingestion of the bait (Hadler and Buckle 1992). This objective could, therefore, lead to the enrichment of the mixture with the most effective or most persistent diastereomer. The characterization of the inhibiting properties of VKOR activity achieved in this study by determining the K_i for each diastereomer showed that the diastereomers of the same SGAR could similarly inhibit VKOR activity (Fig. 7). Therefore, at identical hepatic concentrations, diastereomers of the same SGAR have the same anticoagulant properties when used in warfarin-susceptible rats. In contrast, the toxicokinetic studies conducted herein revealed, as previously shown for difenacoum (Damin et al. 2016), different tissue persistence values between the diastereomers of the same SGAR (Fig. 7). These toxicokinetic studies were conducted in rats after a single oral administration of the AR. This administration was performed by force feeding to better control the dose and time of ingestion. The same dose was used between SGARs regardless of the LD50 to be able to compare the molecules. Only the concentrations of ARs in the liver could be followed for 21 days because plasma and other tissue concentrations rapidly decrease below the LOQ. Two toxicokinetic parameters were calculated in this study, the AUC and half-life. The AUC is the integrated area under the hepatic AR concentration versus time curve. The more the AUC is elevated, the greater the importance of the risk of secondary poisoning of wild predators or scavengers. The results obtained herein demonstrated that, in each mixture of SGAR, there is systematically one diastereomeric form with a lower AUC. The ratios of the AUCs between diastereomers of the same SGAR were 1.5 for difethialone and 3-3.5 for difenacoum, bromadiolone, and brodifacoum. The lowest AUC for all of them

was systematically observed for the minor diastereoisomer, except for flocoumafen, for which the lowest AUC was observed for the major diastereomer of the current commercial preparation. Because AUCs could be affected by absorption or clearance, the half-life of diastereomers in the liver was also calculated. Interestingly, the diastereomer with the lowest AUC systematically corresponded to the diastereomer with the lowest half-life in the liver, suggesting a faster elimination of this diastereomer than of the other one. This result was already demonstrated for difenacoum.

These AUC and half-life differences between diastereomers of the same SGAR could result in major practical consequences. The composition of each SGAR could thus be systematically modified to enrich the mixture with the less persistent diastereomer to obtain a new AR with the same anticoagulant properties but with decreased tissue persistence. Thus, a new bromadiolone containing more than 70% cis-isomers and a new brodifacoum, difenacoum, or difethialone containing more than 70% trans-isomers may be developed to create the new generation of anticoagulants.

The benefits will be greater for the current ARs i) containing essentially the most persistent diastereomer (i.e., bromadiolone with more than 70% trans-isomers and difethialone with more than 70% cis-isomers), and ii) with the most significant differences in half-life between the diastereoisomers (i.e., bromadiolone, difenacoum, and brodifacoum). To illustrate this benefit, the efficiency and persistence of 4 different types of baits were evaluated: a bait containing the current bromadiolone mixture was compared with a bait containing a new bromadiolone mixture containing 93% cis-isomers, and a bait containing the current difethialone mixture was compared with a bait containing a new difethialone mixture containing 94% trans-isomers. Bromadiolone and difethialone were chosen because bromadiolone is the most favorable example to illustrate the concept (highest difference in AUC and half-life and high percentage of the persistent diastereomer in the current mixture),

while difethialone is the most unfavorable example (almost no difference in the AUC between the diastereomers). The baits were all effective, with 100% mortality obtained after 4 days of exposure. However, the baits enriched with the lowest persistent diastereomer systematically showed a decrease in the quantity of residues in the liver at the time of death of the animals. The reduction of the residues in the liver was greater for bromadiolone enriched in cis-isomers with a 4-fold reduction of the residues compared with the current bromadiolone. For difethialone, the use of trans-isomers reduced the liver residues by a factor of approximately 2 compared with the current difethialone.

The development of such baits enriched in the less persistent diastereomer would avoid the ecotoxicological risk associated with their use, especially regarding plant protection. These baits would reduce the amount of residues at the time of death of the rodents. Nevertheless, if these dying rodents with reduced residues are eaten by scavengers or predators, the elimination of such an AR could also be accelerated in the liver of scavengers or predators. Therefore, the ecotoxicological gain could be at both levels, and these TGARs would be a good solution to avoid environmental problems associated with pest management.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Participated in research design: EB, VL

Conducted experiments: BE, EB, IF, MDP, VL

Contributed new reagents or analytic tools: BE, HC, MDP

Performed data analysis: BE, EB, MDP, SL, VL

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: EB, IF, MDP, SL, VL

REFERENCES

- Battersby SA (2004) *The Chartered Institute of Environmental Health - JEHR - Public health policy – can there be an economic imperative? An examination of one such issue.* <http://www.cieh.org/jehr/jehr3.aspx?id=11442>. Accessed 6 April 2016
- Berny P, Esther A, Jacob J, Prescott C (2014) Study on risk mitigation measures for anticoagulant rodenticides as biocidal products final report. *European Union, Luxembourg.*
- Boyle CM (1960) Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature* **188**:517–517.
- Buckle AP, Smith RH (Eds.) (2015) *Rodent pests and their control*, 2nd edn. CAB, Wallingford ; Boston, MA..
- Christensen TK, Lassen P, Elmeros M (2012) High exposure rates of anticoagulant rodenticides in predatory bird species in intensively managed landscapes in Denmark. *Arch Environ Contam Toxicol* **63**:437–444.
- Cort JR, Alperin PJ, Cho H (2012) Measurement and analysis of diastereomer ratios for forensic characterization of brodifacoum. *Forensic Sci Int* **214**:178–181.
- Dodsworth E (1961) Mice and spreading despite such poisons as warfarin. *Munic Eng* **3746**:1668.
- Elmeros M, Christensen TK, Lassen P (2011) Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats *Mustela erminea* and weasels *Mustela nivalis* from Denmark. *Sci Total Environ* **409**:2373–2378.
- European Parliament (2007) *Inclusion of active substances in annex I or IA to directive 98/8/EC. Difethialone. Product-type 14 (rodenticides).* European Parliament, Bruxelles.

- European Parliament (2009) *Inclusion of active substances in annex I or IA to directive 98/8/EC. Flocoumafen. Product-type 14 (rodenticides)*. European Parliament, Bruxelles.
- Fournier-Chambrillon C, Berny PJ, Coiffier O, Barbedienne P, Dassé B, Delas G, Galineau H, Mazet A, Pouzenc P, Rosoux R, Fournier P (2004) Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implications for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *J Wildl Dis* **40**:688–695.
- Furie B, Furie BC (1988) The molecular basis of blood coagulation. *Cell* **53**:505–518.
- Geduhn A, Jacob J, Schenke D, Keller B, Kleinschmidt S, Esther A (2015) Relation between intensity of biocide practice and residues of anticoagulant rodenticides in Red foxes (*Vulpes vulpes*). *PLOS ONE* **10**:e0139191.
- Hadler MR, Buckle A (1992) Forty five years of anticoagulant rodenticides - past, present and future trends. *Proceedings of the Vert Pest Conference*, vol. 15, pp 149–155.
- Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E, Lattard V (2011) Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys* **515**:14–20.
- Hodroge A, Matagrín B, Moreau C, Fourel I, Hammed A, Benoit E, Lattard V (2012) VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J Thromb Haemost* **10**:2535–2543.
- Huckle KR, Hutson DH, Warburton PA (1988) Elimination and accumulation of the rodenticide flocoumafen in rats following repeated oral administration. *Xenobiotica* **18**:1465–1479.

- Hughes J, Sharp E, Taylor MJ, Melton L, Hartley G (2013) Monitoring agricultural rodenticide use and secondary exposure of raptors in Scotland. *Ecotoxicology* **22**:974–984.
- Hunter K, Sharp EA, Newton A (1988) Determination of diastereoisomers of bromadiolone, an anticoagulant rodenticide, in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **435**:83–95.
- Jackson WB, Kaukeinen D (1972) Resistance of wild Norway rats in North Carolina to warfarin rodenticide. *Science* **176**:1343–1344.
- Kelly MJ, Chambers J, MacNicoll AD (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. *J Chromatogr* **620**:105–112.
- Langford KH, Reid M, Thomas KV (2013) The occurrence of second generation anticoagulant rodenticides in non-target raptor species in Norway. *Sci Total Environ* **450–451**:205–208.
- Li T, Chang C-Y, Jin D-Y, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* **427**:541–544.
- Rattner BA, Lazarus RS, Elliott JE, Shore RF, van den Brink N (2014) Adverse outcome pathway and risks of anticoagulant rodenticides to predatory wildlife. *Environ Sci Technol* **48**:8433–8445.
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Müller CR, Strom TM, Oldenburg J (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* **427**:537–541.

- Rost S, Pelz HJ, Menzel S, MacNicoll AD, León V, Song KJ, Jäkel T, Oldenburg J, Müller CR (2009) Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice--a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet* **10**:4.
- RRAC (2015) RRAC guidelines on anticoagulant rodenticide resistance management. *Crop Life Internation*, Brussels.
- Ruiz-Suárez N, Henríquez-Hernández LA, Valerón PF, Boada LD, Zumbado M, Camacho M, Almeida-González M, Luzardo OP (2014) Assessment of anticoagulant rodenticide exposure in six raptor species from the Canary Islands (Spain). *Sci Total Environ* **485–486**:371–376.
- Sage M, Fourel I, Cœurdassier M, Barrat J, Berny P, Giraudoux P (2010) Determination of bromadiolone residues in fox faeces by LC/ESI-MS in relationship with toxicological data and clinical signs after repeated exposure. *Environ Res* **110**:664–674.
- Saunders GR (1978) Resistance to warfarin in the roof rat in Sydney, NSW. *Search* **9**:39–40.
- Serieys LE, Armenta TC, Moriarty JG, Boydston EE, Lyren LM, Poppenga RH, Crooks KR, Wayne RK, Riley SP (2015) Anticoagulant rodenticides in urban bobcats: exposure, risk factors and potential effects based on a 16-year study. *Ecotoxicol Lond Engl* **24**:844–862.
- Siddiq Z, Blaine WD (1982) Anticoagulant resistance in house mice in Toronto, Canada. *Environ Health Rev* **32**:49–51.
- Suttie JW (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem* **54**:459–477.
- Swaine H (1985) Rodenticides. Imperial Chemical Industries PLC, *European Patent Office*, EP0147052 B1 (1985).
- Thomas PJ, Mineau P, Shore RF, Champoux L, Martin PA, Wilson LK, Fitzgerald G, Elliott JE (2011) Second generation anticoagulant rodenticides in predatory birds:

- probabilistic characterisation of toxic liver concentrations and implications for predatory bird populations in Canada. *Environ Int* **37**:914–920.
- Vandenbroucke V, Bousquet-Melou A, De Backer P, Croubels S (2008) Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J Vet Pharmacol Ther* **31**:437–445.

FOOTNOTES

This work was supported by Bpi France [Grants ISI n°I1301001W “NEORAMUS”].

FIGURES LEGENDS

Fig. 1. Chromatograms of the diastereomers of brodifacoum (BDF), flocoumafen (FLO), difenacoum (DFC), bromadiolone (BDL), and difethialone (DFT).

Fig. 2. Structures of the cis- and trans-isomers of flocoumafen (A). The cis- and trans-isomers referenced in the text arise from the alternative orientations of the substituents on the tetralin ring system. Time-dependent concentrations of the cis- and trans-isomers of flocoumafen after the *per os* administration of, respectively, 3 mg.kg⁻¹ of silica gel column-purified cis- or trans-isomers of flocoumafen to susceptible rats. The results are the mean ± SD of four rats. The time points are 24, 72, 168, 336, and 504 hours, which correspond, respectively, to 1, 3, 7, 14, and 21 days (B).

Fig. 3. Structures of the cis- and trans-isomers of difethialone (A). The cis- and trans-isomers referenced in the text arise from the alternative orientations of the substituents on the tetralin ring system. Time-dependent concentrations of cis- and trans-isomers of difethialone after the *per os* administration of, respectively, 3 mg.kg⁻¹ of purified cis- or trans-isomers of difethialone to susceptible rats. The results are the mean ± SD of four rats. The time points are 24, 72, 168, 336, and 504 hours, which correspond, respectively, to 1, 3, 7, 14, and 21 days (B).

Fig. 4. Structures of the cis- and trans-isomers of brodifacoum (A). The cis- and trans-isomers referenced in the text arise from the alternative orientations of the substituents on the tetralin ring system. Time-dependent concentrations of cis- and trans-isomers of brodifacoum after the *per os* administration of, respectively, 3 mg.kg⁻¹ of silica gel column-purified cis- or trans-

isomers of brodifacoum to susceptible rats. The results are the mean \pm SD of four rats. The time points are 24, 72, 168, 336, and 504 hours, which correspond, respectively, to 1, 3, 7, 14, and 21 days (B).

Fig. 5. Structures of the cis- and trans-isomers of bromadiolone (A). The cis- and trans-isomers referenced in the text arise from the alternative orientations of the substituents on the tetralin ring system. Time-dependent concentrations of cis- and trans-isomers of bromadiolone after the *per os* administration of, respectively, 3 mg.kg⁻¹ of purified cis- or trans-isomers of bromadiolone to susceptible rats. The results are the mean \pm SD of four rats. The time points are 24, 72, 168, 336, and 504 hours, which correspond, respectively, to 1, 3, 7, 14, and 21 days (B).

Fig. 6. Structures of the cis- and trans-isomers of difenacoum (A). The cis- and trans-isomers referenced in the text arise from the alternative orientations of the substituents on the tetralin ring system. The time-dependent concentrations of the cis- and trans-isomers of difenacoum after the *per os* administration of, respectively, 3 mg.kg⁻¹ of purified cis- or trans-isomers of difenacoum to susceptible rats. The results are the mean \pm SD of four rats. The time points are 24, 72, 168, 336, and 504 hours, which correspond, respectively, to 1, 3, 7, 14, and 21 days (B).

Fig. 7. 2D-representation of the biological properties of cis- and trans-of SGAR

TABLES

Table 1. Pharmacokinetic parameters in the liver after the single oral administration of the cis- or trans-isomers of anticoagulant rodenticides in susceptible rats at a dose of 3 mg.kg⁻¹.

Molecule	AUC (µg.h.g ⁻¹)	t _{1/2} (h) [95% CI]	
DFC cis-isomers	709,4 ± 206,10 *	78.33 [64.66-99.33]	p=0.0044
DFC trans-isomers	236,8 ± 87,37 *	24.18 [14.67-68.56]	
BDF cis-isomers	4827 ± 830,40 *	120.82 [110.74-732.89]	p<0.0001
BDF trans-isomers	1665 ± 242,80 *	68.73 [57.28-85.84]	
FLO cis-isomers	1247 ± 176,00	76.73 [60.48-104.91]	p<0.0001
FLO trans-isomers	2713 ± 446,00	177.45 [145.13-228.31]	
BDL cis-isomers	822,7 ± 131,40 *	26.89 [19.65-42.55]	p<0.0001
BDL trans-isomers	2733 ± 379,90 *	75.62 [64.72-90.96]	
DFT cis-isomers	2410 ± 308,00 *	71.60 [44.52-61.78]	p=0.0310
DFT trans-isomers	1894 ± 459,00 *	52.93 [46.36-61.67]	

* denotes a significant difference between two groups (AUC of cis- or trans-isomers in isolated administration) with $\alpha < 0.05$ by using a Mann-Whitney test. (DFC, difenacoum; BDF, brodifacoum; FLO, flocoumafén; BDL, bromadiolone; DFT, difethialone)

Table 2. K_i values of the VKOR activity catalyzed by warfarin-susceptible rat liver microsomes for the cis- and trans-isomers of each SGAR.

(nM)	K _i of VKOR activity toward:	
	cis-isomers	trans-isomers
Brodifacoum	18 ± 2	22 ± 1
Bromadiolone	31 ± 2	26 ± 2
Difenacoum	17 ± 1	21 ± 2
Difethialone	27 ± 1	22 ± 1
Flocoumafen	47 ± 2	55 ± 5

To determine the VKOR activity, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl and 0.5 g.L⁻¹ of microsomal proteins. Each data point represents the mean±SD of three individual analyses. * Comparison between two groups was performed using the Mann-Whitney test with p<0.05

Table 3. No-choice feeding test with the cis- or trans-isomers of bromadiolone and difethialone.

Bait containing	Number of death	Day of death	Bait (g)	Consumption of			Residues ($\mu\text{g}/\text{liver}$)			% residues / total AR ingested
				cis-isomers (μg)	trans-isomers (μg)	cis-isomers (μg)	trans-isomers (μg)	Total residues (μg)		
BDL, 50 ppm 93% cis /7% trans	6/6	6	44	2025	152	25	32	57	2.6	
BDL, 50 ppm 2% cis /98% trans	6/6	5	47	47	2292	236	0	236	10.1	
DFT, 15 ppm 94% cis /6% trans	5/5	5	49	44	691	43	4	47	6.4	
DFT, 15 ppm 1% cis /99% trans	5/5	5	47	695	7	0	71	71	10.2	

The daily consumption of bait was measured, and the liver of each rat was collected after death. The concentrations of the different isomers were measured in the liver. The results are the mean of 10 rats.

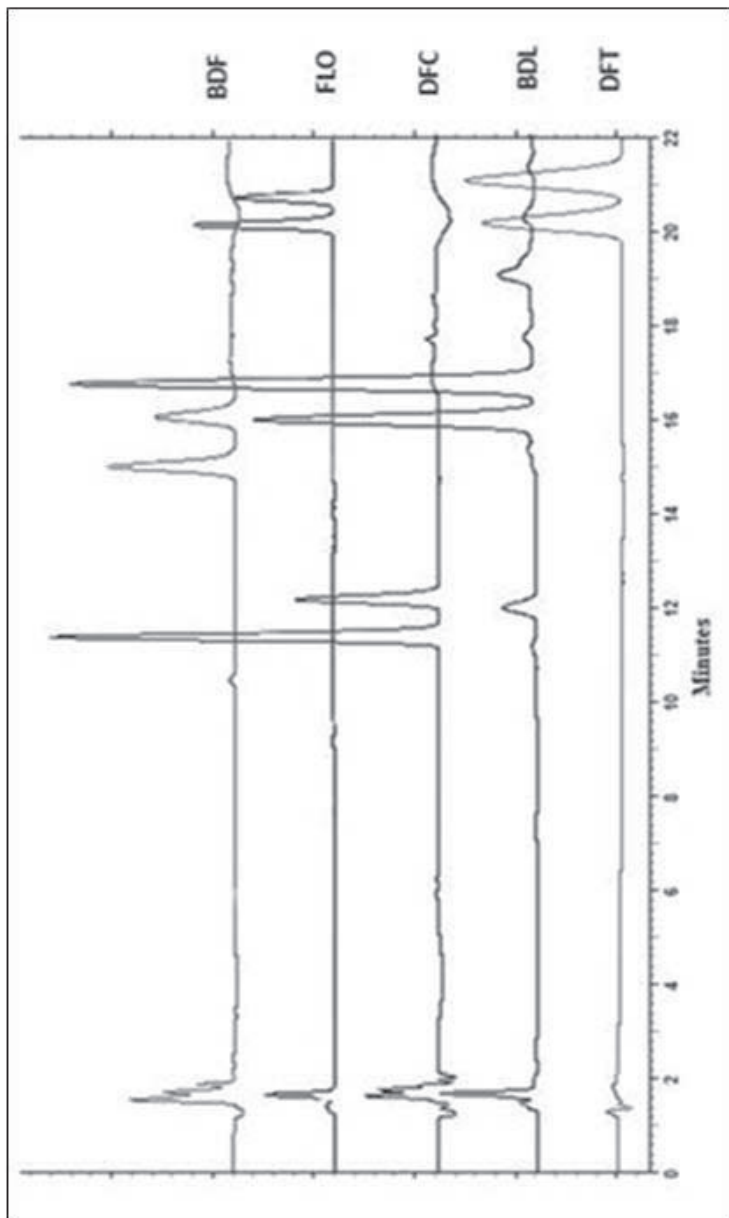


Fig. 1.

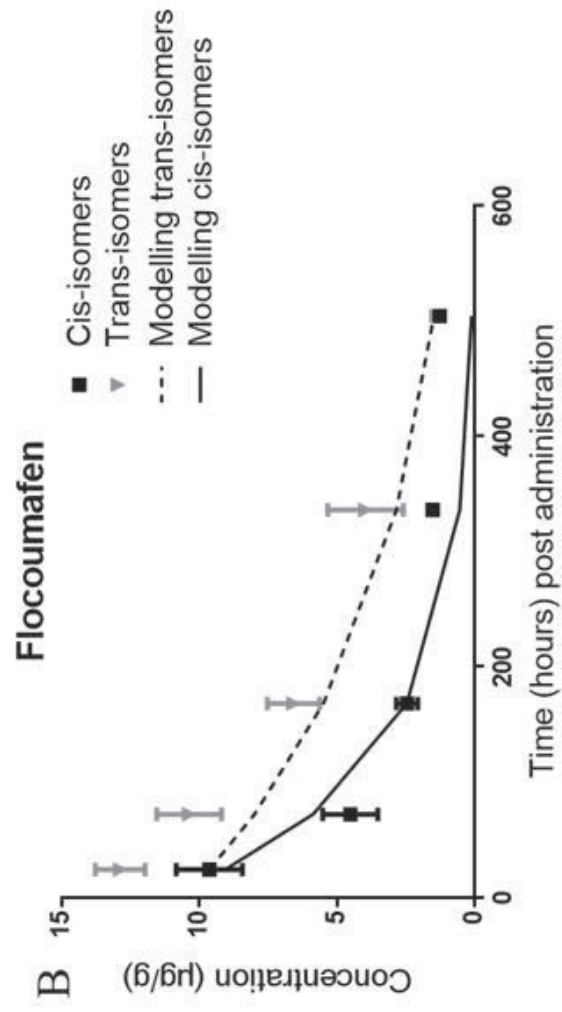
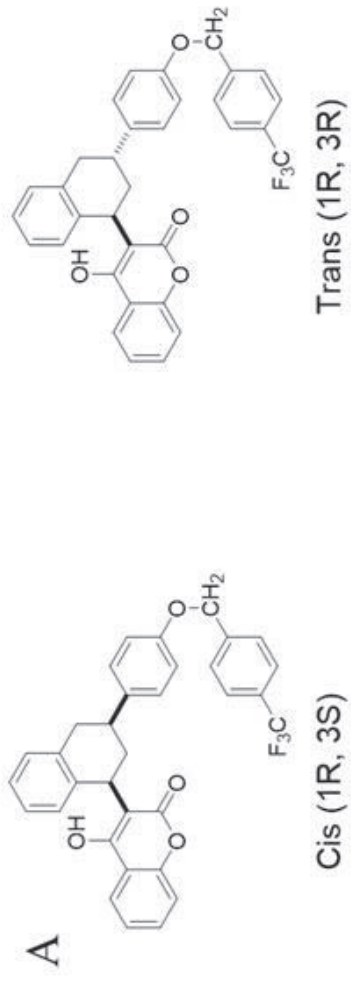


Fig. 2.

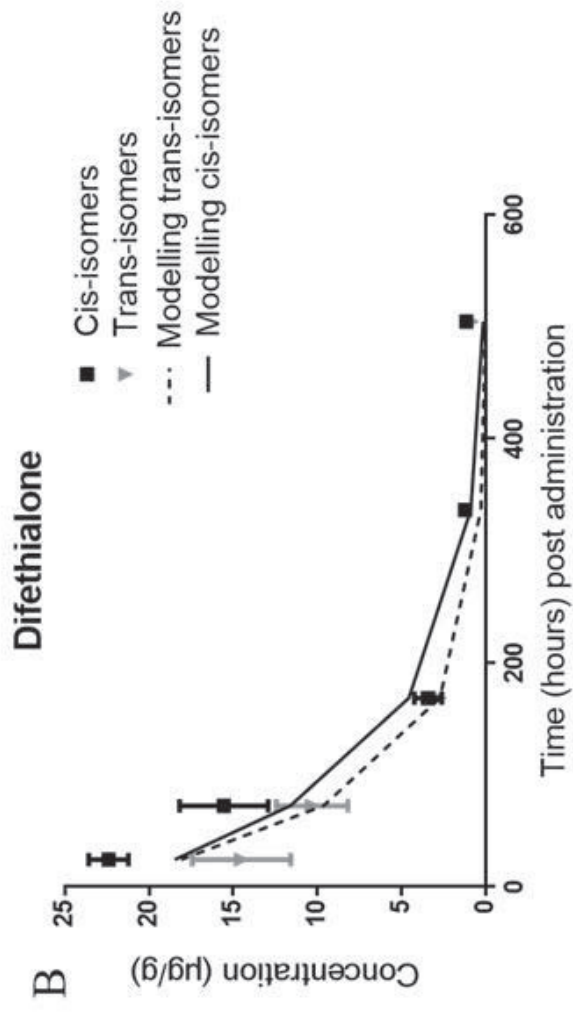
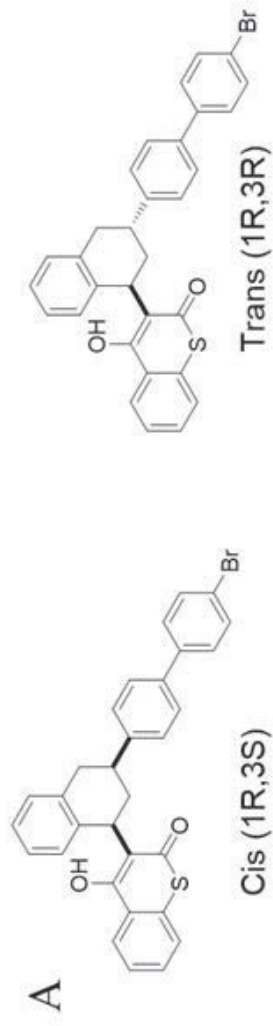


Fig. 3.

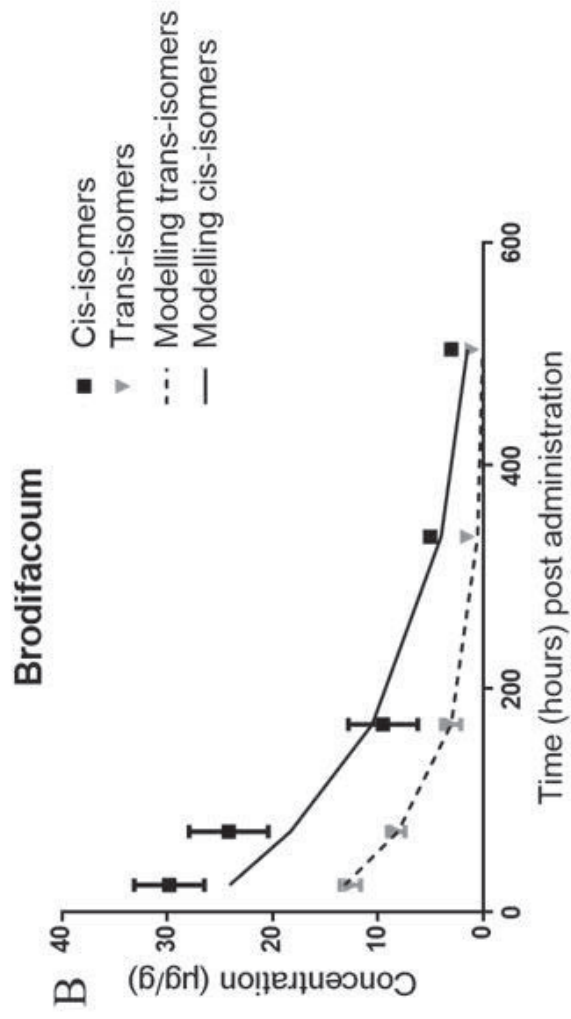
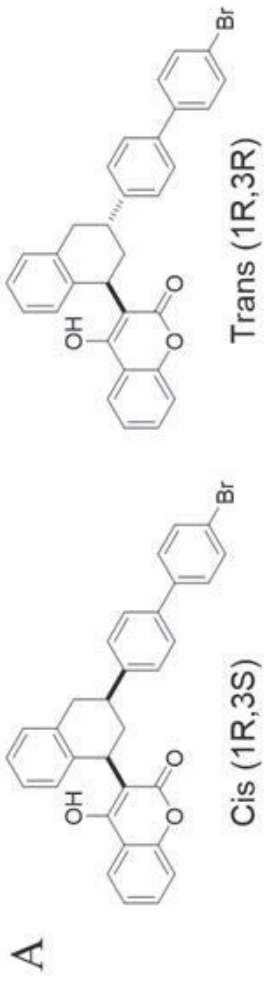
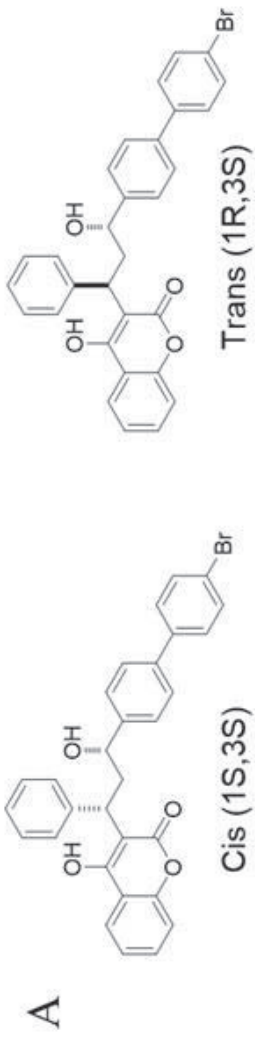


Fig. 4.



Bromadiolone

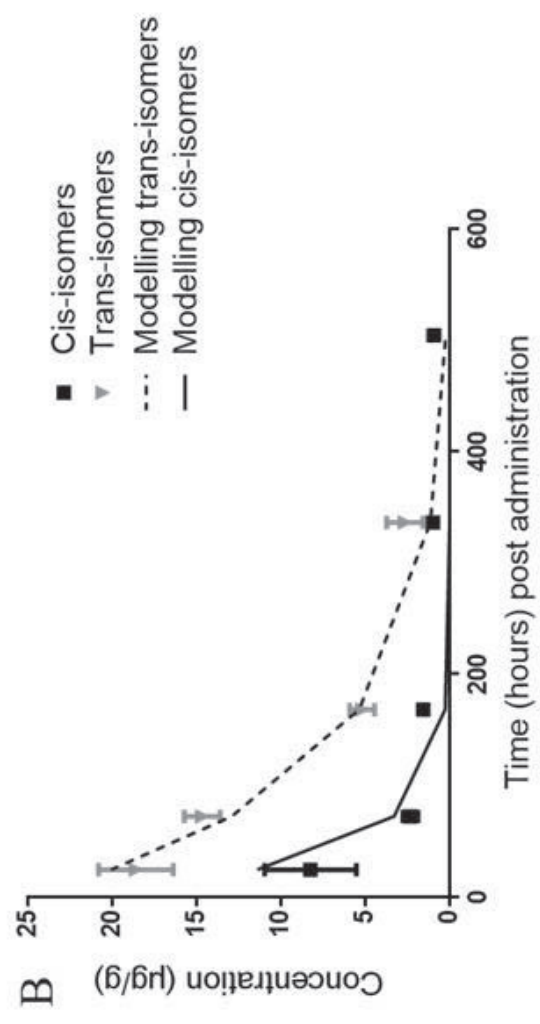


Fig. 5.

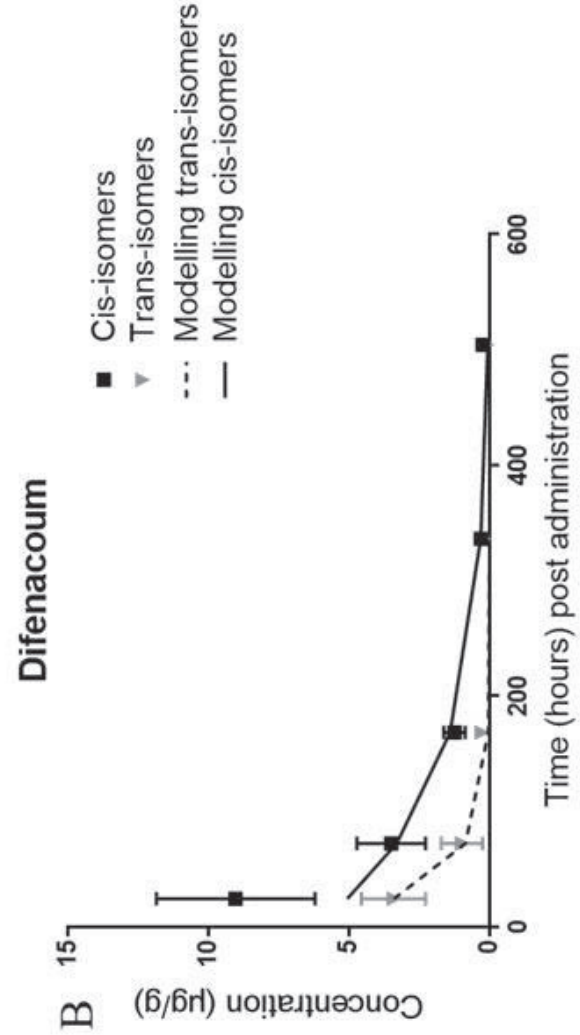
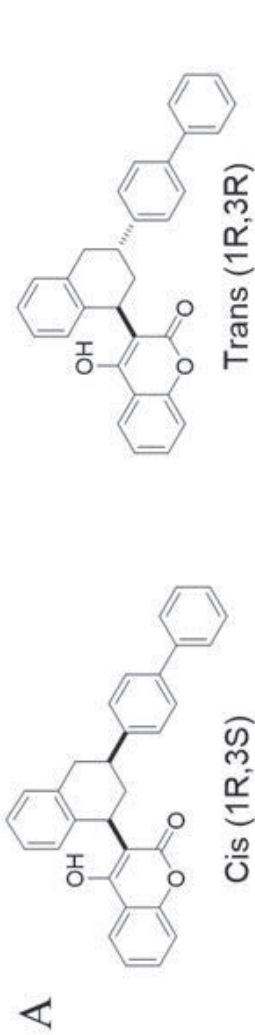


Fig. 6.

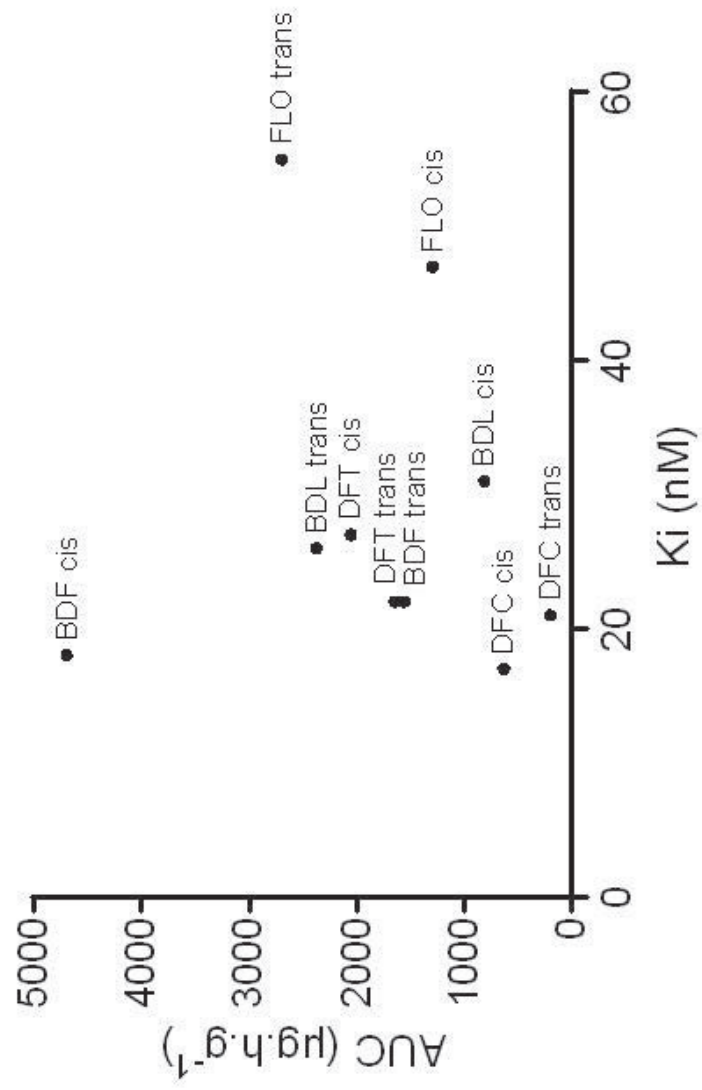


Fig. 7

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le travail présenté dans ce mémoire traite de l'origine de la résistance naturelle aux AVK du rat femelles et des perspectives de nouveaux AVK efficaces et peu rémanents. Le départ de ce projet vient d'une constatation faite lors de la mise en place des premiers tests standardisés pour détecter les rats résistants aux AVK et déterminer l'efficacité de ces molécules : les femelles présentaient une moins forte sensibilité aux AVK par rapport aux rats mâles [63]. De ce constat découle la première problématique de cette thèse : quelle est l'origine de cette résistance ? En effet, jusqu'à présent l'étude de l'origine cette résistance n'était faite qu'à la marge d'expérimentations n'ayant pas ce but. Ainsi de nombreuses hypothèses ont été faites sur cette origine. Nous en avons retenu quatre afin de les tester : (i) une activité microsomale responsable de la régénération de la vitamine K plus efficace chez les femelles; (ii) une élimination plus rapide des AVK par les rats femelles; (iii) des concentrations basales et des demi-vies des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants plus élevées chez les femelles.

Cette légère résistance des femelles conduit à une augmentation de la dose efficace et à une augmentation du risque d'ingestion d'une dose sublétales d'AVK ou à une augmentation de la durée de vie du rat à l'issue d'une ingestion létale. De plus, les AVK sont réputés pour être fortement rémanents. Ainsi, si en raison d'une résistance liée au sexe ou à une mutation, les rongeurs sont plus tolérants aux AVK, ils augmentent le risque de contaminer leurs prédateurs par contamination secondaire. Pour diminuer l'écotoxicité secondaire des AVK, il est nécessaire de diminuer leur rémanence et d'augmenter leur efficacité sur les individus résistants. Le second objectif de cette thèse est d'étudier les propriétés de certains AVK afin de proposer des solutions efficaces et durables dans la gestion des populations de rongeurs. Ce travail inclut notamment l'étude des anticoagulants naturellement produits par la grande fêrulle (*Ferula communis*). Cette étude tente de déterminer à la fois les conditions de production de ces molécules et leur efficacité dans l'inhibition du cycle de régénération de la vitamine K.

V.1 ÉTUDE DES CARACTERISTIQUES DE VKORC1 DES MICROSOMES DE FOIES PROVENANT DE RATS MALES ET FEMELLES

Dans le but de déterminer si l'activité microsomale responsable de la régénération de la vitamine K était plus efficace et moins sensible aux AVK chez les rats femelles, nous avons étudié *in vitro* les propriétés enzymatiques de la fraction microsomale de foies provenant de rats mâles et femelles. Les valeurs médianes des caractéristiques enzymatiques des microsomes sont résumées dans le Tableau IX. Le seul paramètre semblant être statistiquement différent entre les rats mâles et les rats femelles est l'activité spécifique qui est plus de deux fois supérieure chez les femelles par rapport aux mâles. Cette augmentation est à mettre en relation avec l'expression du gène *Vkorc1* qui est significativement plus importante chez les femelles. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les constantes d'inhibition qu'elles soient obtenues avec de la difethialone ou de la warfarine.

Ainsi, les microsomes des femelles ne sont pas moins sensibles aux AVK que ceux des mâles. On observe une activité spécifique plus importante pour les microsomes des femelles. Cependant, nous ne pouvons pas attribuer clairement l'origine de cette augmentation de l'activité spécifique. Une hypothèse, soutenue par le niveau d'expression de *Vkorc1* dans le foie des femelles, est que l'enzyme VKORC1 soit présente en plus grande proportion par rapport aux autres protéines contenues dans les microsomes. En effet, l'activité spécifique est calculée en fonction des protéines totales des microsomes et non en fonction de la quantité de VKORC1. Ce biais est dû à la difficulté actuelle de mesurer la concentration de VKORC1 dans les microsomes de manière efficace. De même, sans connaître la concentration de VKORC1 il n'est pas possible de déterminer l'efficacité catalytique de l'enzyme.

Une autre hypothèse pouvant expliquer cette augmentation de l'activité spécifique serait l'environnement microsomal de VKORC1. En effet, une étude récente a montré que les composants de la membrane microsomale influencent l'activité de VKORC1 [86]. Or, les compositions des membranes lipidiques diffèrent selon le sexe [24, 30]. L'étude de cette hypothèse nécessiterait la purification de l'enzyme VKORC1 obtenu dans les microsomes puis la modification des membranes microsomales. Cette purification est un point critique dans l'étude de VKORC1. En effet, l'enzyme étant membranaire il est difficile de la purifier sans lui

faire perdre son activité et actuellement seules des enzymes VKORC1 modifiées et exprimées dans des modèles hétérologues ont pu être purifiées en conservant leur activité [14, 32].

Alors que les rats femelles sont plus résistants phénotypiquement que les rats mâles, nous avons montré que cette résistance n'était pas liée à une plus faible activité inhibitrice des AVK sur VKORC1. Cependant, nous ne pouvons actuellement pas conclure sur l'efficacité de l'enzyme, qui pourrait être légèrement plus efficace chez les femelles. À présent il serait intéressant d'étudier *in vivo* l'effet des AVK sur la coagulation des rats mâles et femelles afin de mieux cerner les possibles origines des différences constatées dans la littérature. Cependant, le test utilisé couramment pour suivre l'anticoagulation des AVK chez le rat, le temps de Quick, est peut-être un peu limité pour étudier en profondeur l'action des AVK. Par conséquent, nous avons comparé un ensemble de technique d'étude de la coagulation.

Tableau IX : résumé des valeurs médianes pour les mâles et les femelles de l'étude de l'activité enzymatique VKOR. Les valeurs entre crochets sont les valeurs minimales et maximales obtenues.

Genre	Km (μM)	Activité spécifique ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Ki (μM de warfarine)
Mâles	43.1 [32.9-76.8]	73.3 [46.7-98.3]	0.24 [0.21-0.36]
Femelles	95.75 [75.87-173.6]	151.3 [129.6-280.6]	0.33 [0.13-0.45]
Valeur P	0.057	0.029	0.657

V.2 RAFFINEMENT DES METHODES D'EXPLORATION DE LA COAGULATION DANS LE CADRE DE L'EVALUATION DE LA RESISTANCE AUX AVK

Afin d'étudier l'action des AVK *in vivo*, il nous a fallu déterminer quel paramètre été le plus à même de suivre l'anticoagulation vitamine K dépendante chez le rat. Le paramètre le plus couramment utilisé dans les tests pour étudier l'efficacité des AVK est le temps de quick. Cependant, ces dernières années des techniques d'étude plus globale de la coagulation (La thromboelastometrie et le test de génération de thrombine) ont eu un regain d'intérêt notamment grâce à leur automatisation. Ceci leur a permis d'être plus fiables et plus facilement utilisables. Ces méthodes pourraient améliorer le suivi de l'action des AVK et ainsi diminuer le nombre de rongeurs nécessaire pour les tests. Les paramètres de cinq techniques d'analyse de la coagulation (temps de Quick, temps de céphaline kaolin, test de génération de thrombine et thromboelastometrie : avec de réactifs activant soit la voie endogène de la coagulation : inTEM, soit la voie du facteur tissulaire : exTEM) et l'activité des quatre facteurs de la coagulation vitamine K dépendants (facteur II, VII, IX et X) ont été analysés pendant 24h sur des rats mâles à la suite d'une administration d'un AVK.

Concernant le temps de Quick, l'étude a confirmé sa fiabilité et sa rapidité d'évolution (temps de doublement de 7.22 h). Cependant, cette évolution n'est significative qu'après un temps de latence de 2 heures. Pour ce qui est du temps de céphaline kaolin son évolution est plus lente et le temps de latence plus important.

Cependant, nos résultats ont permis d'écarter les méthodes de thromboélastométrie. En effet, durant les 24 h suivant l'administration d'un AVK, aucun paramètre obtenu avec des réactifs inTEM n'est significativement modifié et seuls certains paramètres de la thromboélastométrie avec des réactifs exTEM sont significativement modifiés (CT et CFT). Cependant, ces derniers paramètres ne semblent pas appropriés pour suivre l'anticoagulation induite par des AVK. En effet, ils évoluent après un temps de latence de plusieurs heures (entre huit et dix heures) et cette évolution est très variable. Cette difficulté de suivre une anticoagulation induite par des anti-vitamines K avec la thromboélastométrie a aussi été décrite en médecine humaine [42]. De plus, la technique actuellement décrite pour faire une thromboélastométrie sur du sang de rongeur impose que le test soit réalisé dans les 30

minutes, ce qui complique son utilisation vis-à-vis des autres méthodes qui peuvent être faites sur du plasma congelé.

La seconde méthode innovante mise en place pour suivre l'anticoagulation est le test de génération de thrombine (TGT). Cette méthode a été mise en place avec l'aide de G. Jourdi et du Docteur V. Siguret de l'unité de recherche UMR S1140. L'intérêt de cette méthode est de déclencher la réaction de coagulation avec une quantité d'activateur (facteur tissulaire) beaucoup plus proche de la réalité par rapport au temps de Quick, qui utilise le facteur tissulaire en fort excès. Cependant les premiers tests ont montré que la génération thrombine était rapidement inhibée quelques heures après l'administration de diféthialone. Une dilution du plasma à tester dans un plasma non anticoagulé permet de régénérer la génération de thrombine. Néanmoins, après cette dilution deux paramètres issus de ce test ne sont plus exploitables : le temps de latence et le temps au pic. En effet, la dilution apporte suffisamment de facteurs de la coagulation pour initier et entretenir la réaction dans un temps normal. Les seuls paramètres mesurables sont ceux liés à la concentration de prothrombine dans le plasma. Ainsi l'analyse ne pourra se faire que sur la hauteur du pic (PH) et le potentiel endogène de thrombine (ETP). Ces deux paramètres ont permis de suivre correctement l'anticoagulation avec des temps de demi-vie de 10,4h pour le PH et de 10,5 pour le ETP. Ce qui est un peu moins bien que le temps de Quick. Le paramètre ETP du TGT avec du plasma dilué dans du plasma sain est équivalent à un dosage indirect de la prothrombine. Ainsi, le dosage direct des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants pourrait être une bonne méthode pour suivre l'action des AVK.

Le dosage des facteurs de la coagulation vitamine K dépendant, après l'administration de la dose d'AVK, a permis de mettre en évidence que ceux-ci étaient de bons paramètres pour suivre l'anticoagulation. En effet, pour deux d'entre eux, le facteur VII et le facteur X, ils ont des demi-vies significativement plus faibles que le temps de doublement du temps de Quick, respectivement de 2,7h et de 4,9h. De plus, le temps de latence est de 1h pour le facteur X et aucun temps de latence n'a été mis en évidence avec le facteur VII. Cependant le facteur VII présente un désavantage lié à sa demi-vie, il n'est presque plus détectable 20h après l'administration d'une dose létale de diféthialone. Ce qui limite son utilisation au suivi précoce de l'action des AVK. La Figure 18 reprend les demi-vies et les temps de doublement des différents paramètres.

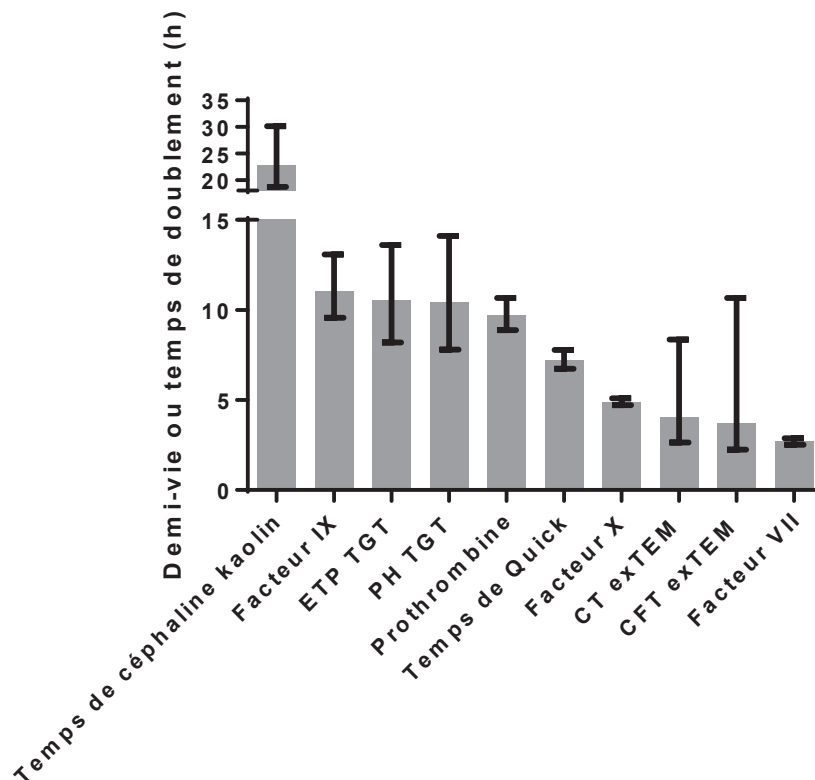


Figure 18 : Résumé des valeurs de demi-vie ou de temps de doublement pour les différents paramètres. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%.

Dans le but d'utiliser la mesure de l'activité des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants pour suivre l'action des AVK, il est nécessaire de s'assurer de la corrélation entre l'évolution des facteurs et le temps de Quick. En médecine humaine, de nombreuses études ont été réalisées pour analyser l'importance des différents facteurs de la coagulation sur le temps de Quick, notamment en utilisant des dilutions de ces facteurs [137]. De plus, d'autres études ont permis de caractériser les propriétés enzymatiques de chacune des réactions de la cascade de la coagulation, permettant alors de modéliser cette cascade *in silico* et de déterminer l'importance de la concentration de chaque facteur sur les temps de coagulation [91, 159]. Cependant, trop peu d'informations sont disponibles pour modéliser la coagulation des rongeurs. Néanmoins, l'étude de l'évolution des facteurs de la coagulation par rapport au temps de Quick pourrait aider à déterminer qu'elle est le facteur déterminant le temps de Quick lors des intoxications aux AVK chez le rat. La difficulté est que tous les facteurs vitamine K dépendants diminuent en même temps à la suite de l'administration d'un AVK. Il est alors impossible d'individualiser l'action de chacun. Nous avons proposé l'hypothèse que si un facteur vitamine K dépendant déterminait l'évolution du temps de Quick à la suite de l'administration d'un AVK, il devrait aussi déterminer l'évolution de la restauration du temps

de Quick à la suite de l'administration de Vitamine K₁. Ainsi, les courbes obtenues en exprimant ce facteur par rapport au temps de Quick, lors de la décroissance des facteurs de la coagulation et lors de la régénération des facteurs devraient être les mêmes. Dans notre expérience seul le facteur X remplit ce critère (Figure 19). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse de Kerins and MacNicoll [90] qui postulait que le facteur X avait plus d'effet sur le temps de Quick que les autres facteurs vitamine K dépendants. Cette relation entre le temps de Quick et le facteur X pourrait être utile pour améliorer le suivi de l'action des anticoagulants dans les tests réglementaires et les tests de résistances. En effet, l'évolution du facteur X est plus précoce et plus importante que celle du temps de Quick, ce qui pourrait permettre d'utiliser moins d'animaux pour les tests. Cependant cette méthode doit encore être validée avec d'autres lignées de rat, notamment des rats résistants.

Le suivi de l'action d'un AVK par le dosage direct des facteurs de la coagulation est réalisé dans certains cas en médecine humaine. En effet, certaines affections, comme le lupus anticoagulant, peuvent modifier l'INR indépendamment de l'action de l'AVK. Dans ces cas, afin de suivre l'action de l'anticoagulant, la mesure de la concentration de la prothrombine ou du facteur X est réalisée [13]. En effet, les tests de dilution et les modélisations de la coagulation semblent indiquer que la prothrombine est le facteur déterminant du temps de Quick chez l'homme [91, 179]. Il est à noter que le dosage de la prothrombine ne peut se faire avec la même méthode chez l'homme que celle que nous avons utilisée. En effet dans le réactif que nous avons utilisé dans la mesure de l'activité de la prothrombine, l'écarine, transforme indifféremment la prothrombine γ -carboxylée et celle qui ne l'est pas en meizothrombine [21]. Cette technique peut être utilisée chez le rat, mais pas pour l'homme. En effet, le rat ne libère pas dans le sang la forme décarboxylé de la prothrombine à l'inverse de l'homme [69]. Une possibilité pour doser uniquement la forme γ -carboxylée de la prothrombine est d'utiliser une modification du temps de Quick. Dans cette version le temps de Quick est mesuré à partir d'un plasma à doser qui est dilué dans un plasma dépourvu de prothrombine. Ainsi le facteur limitant de la réaction est la concentration de prothrombine du plasma test. Par conséquent, le temps de Quick modifié est inversement proportionnel à la concentration du plasma en prothrombine.

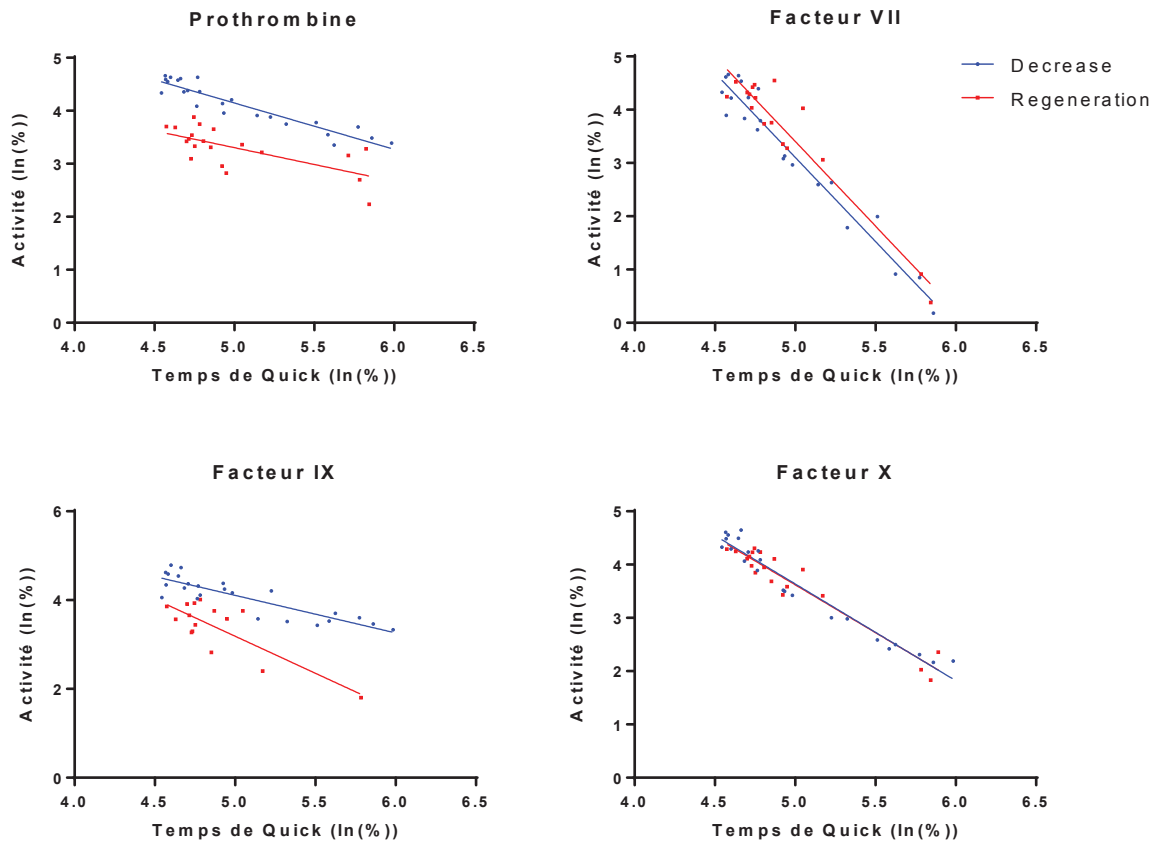


Figure 19 : Évolution de l'activité des facteurs de la coagulation par rapport au temps de Quick durant la décroissance des facteurs et leur régénération.

V.3 ÉTUDE DES PARAMETRES DE LA COAGULATION BASALE EN FONCTION DU GENRE

Afin de comparer la coagulation basale des rats mâles et femelles, nous avons analysé les paramètres de la coagulation basale du sang provenant de rats mâles et femelles. En accord avec nos études sur les méthodes d'étude de la coagulation nous avons suivi le temps de Quick et les facteurs de la coagulation vitamine K dépendants. Cette analyse a mis en évidence plusieurs différences significatives entre les mâles et les femelles. Le premier paramètre différenciant est le temps de Quick qui est significativement plus faible chez les femelles. Une différence équivalente a été mise en évidence dans l'espèce humaine [12]. Cependant, l'étude du temps de coagulation chez les rats de la lignée Wistar [103] a mis en évidence que le temps de quick est plus élevé chez les femelles. Les rats ont à peu près le même âge et le même stade physiologique dans ces deux études, mais il y a deux différences avec notre étude : la lignée et l'alimentation. Concernant l'alimentation, elle n'est pas décrite dans l'article de Lemini, mais celle de notre étude est déficiente en vitamine K pour éviter une incidence de l'alimentation sur l'étude. Cependant, ces deux hypothèses ne peuvent expliquer avec un niveau de doute raisonnable les différences de résultat entre les deux études.

Une seconde similitude avec les résultats obtenus en médecine humaine a été remarquée. En effet, les activités en facteur VII et X sont significativement plus élevées chez les rats femelles par rapport aux mâles (Tableau X), comme observées en médecine humaine [49, 87]. Ces différences peuvent en partie expliquer une voie du facteur tissulaire de la coagulation plus efficace chez les rats femelles comme mis en évidence par les données des temps de Quick. Cependant contrairement aux données obtenues chez l'homme nous n'avons pas mis en évidence de différence significative pour les deux autres facteurs de la coagulation vitamine K dépendants. Ceci pourrait être dû au manque de puissance de notre étude avec seulement 8 animaux de chaque genre.

Tableau X : Bilan des valeurs remarquables des facteurs de la coagulation : concentration basale relative plus ou moins l'écart type et temps de demi-vie et son intervalle de confiance à 95%.

	CONCENTRATION BASALE (%)		TEMPS DE DEMI-VIE (H)	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
PROTHROMBINE	100 ± 7,5	108,3 ± 12,8	9,7 [8,9-10,6]	12,4 [11,3-13,6]**
FACTEUR VII	100 ± 19	142,7 ± 14,7**	2,8 [2,6-3,1]	3,0 [2,5-3,7]
FACTEUR IX	100 ± 28,7	110,3 ± 26,2	11,4 [8,6-16,7]	13,8 [11-18,4]
FACTEUR X	100 ± 14,4	121,1 ± 10,4*	5,2 [5,0-5,4]	5,7 [5,4-6,1]*

*valeur P <0,01

**valeur P <0,001

V.4 ÉTUDE COMPAREE DE L'ÉVOLUTION DES PARAMETRES DE LA COAGULATION APRES ADMINISTRATION DE DIFETHIALONE CHEZ DES RATS MALES ET FEMELLES

Les mêmes paramètres de la coagulation ont été suivis pendant 72h après blocage du cycle de régénération de la vitamine K avec une dose létale de difethialone (10 mg.kg^{-1}), afin de permettre de mieux caractériser les possibles origines de la moins grande sensibilité des rats femelles aux anticoagulants anti-vitamines K. Avant même l'étude des paramètres de la coagulation nous avons pu remarquer la plus grande sensibilité des mâles par le fait que trois d'entre eux sont morts prématurément par hémorragies, alors qu'aucune femelle n'a succombé prématurément. L'étude de l'évolution du temps de Quick permet de remarquer que durant les trente-deux premières heures, au moins, le temps de Quick des femelles reste inférieur à celui des mâles (Figure 20). Cela peut notamment s'expliquer par le temps de latence avant l'augmentation du temps de Quick. En effet, celui-ci est de 2 heures pour les mâles, mais de 8 heures pour les femelles. Ces éléments confirment la résistance naturelle des femelles. Pour expliquer les différences observées avec le temps de Quick, nous avons vérifié si cette différence n'avait pas pour origine la pharmacocinétique de la difethialone. Le dosage de la diféthialone circulante et hépatique montre des concentrations plus importantes chez les femelles. Ainsi, à l'opposé des hypothèses avancées pour la bromadiolone [111], il semble que les femelles éliminent moins la diféthialone que les mâles. Il est alors nécessaire d'étudier d'autres origines pour expliquer la différence de sensibilité.

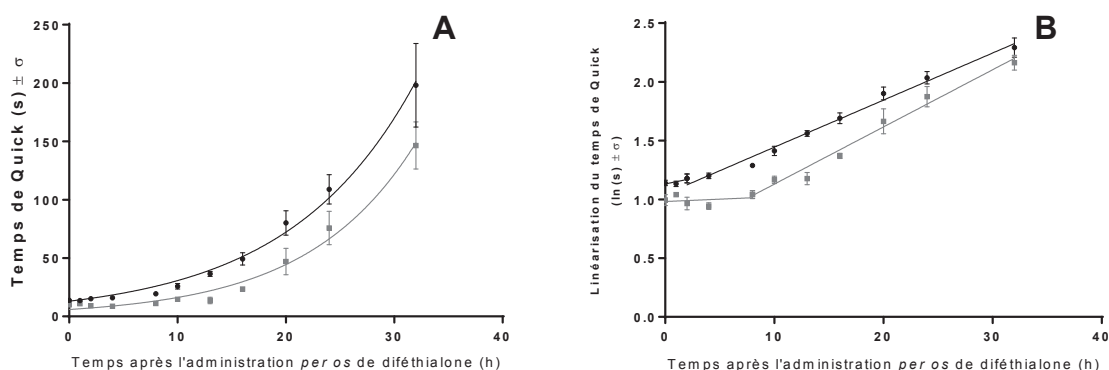


Figure 20: Evolution du temps de Quick après administration d'une dose létale de difethialone chez des rats mâles (noir) et femelles (gris). (A) valeurs brutes en seconde du temps de Quick. (B) Valeurs après linéarisation par la fonction du logarithme népérien.

L'étude a mis en évidence des différences de demi-vies entre mâle et femelle pour deux facteurs de la coagulation. Pour la prothrombine et le facteur X, les demi-vies sont respectivement plus grandes de 28 % et 10% pour les femelles par rapport aux mâles (Tableau X). Ceci, ajouté à la plus forte concentration basale du facteur X, pourrait être un début d'explication de la plus grande tolérance des femelles aux AVK.

Concernant le facteur VII, on observe une latence de 4 heures avant sa décroissance chez les femelles. Il n'y a pas de latence observable chez les mâles. Si on ne prend pas en compte cette période de latence, dans le but de calculer une demi-vie au sens strict pour le facteur VII, il n'y a pas de différence significative de la demi-vie du facteur VII entre les mâles et les femelles. Cependant, si on prend en compte cette période, il faut 5,8 heures pour que la concentration en facteur VII des femelles soit divisée par deux, soit deux fois plus de temps que pour les mâles. Par conséquent, cette capacité de maintenir quelques heures une concentration plus élevée de facteur VII peut aussi participer à la plus grande tolérance des femelles aux anticoagulants.

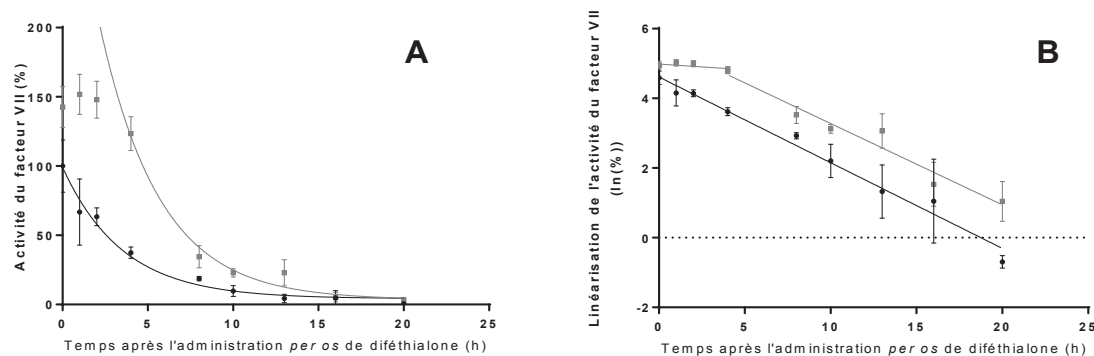


Figure 21 : Evolution du facteur VII après administration d'une dose létale de diféthialone chez des rats mâles (noir) et femelles (gris). (A) valeurs brutes en pourcentage d'activité (activité basale des mâles définie à 100%). (B) Valeurs après linéarisation par la fonction du logarithme népérien.

Le maintien de l'activité du facteur VII pourrait être dû au maintien de l'activité de GGcX chez les femelles durant les premières heures suivant l'administration d'antivitamine K. Comme les concentrations hépatiques en diféthialone sont bien supérieures pour les rats femelles que les rats mâles, et que l'enzyme VKORC1 des femelles est tout aussi sensible que celle des mâles aux AVK, cela suggère que la vitamine K hydroquinone nécessaire à l'activité du cycle de GGcX ne provient pas du cycle de régénération, mais d'un stock. Dans cette hypothèse on peut penser que les mâles ne recyclent que la quantité de vitamine K nécessaire pour leur besoin physiologique alors que les femelles en recyclent plus que leur besoin. Une

étude précédente a montré que les rats femelles avaient une concentration plus importante en vitamine K dans le foie [81]. Ce qui laisse à penser que le recyclage de la vitamine K par VKORC1 chez les rats femelles est plus efficace ou que la quantité de VKORC1 hépatique est plus élevée chez les femelles par rapport aux mâles. Ce dernier point est appuyé par notre étude, en effet, le niveau d'ARN messagers hépatiques de *vkorc1* est plus élevé chez les rats femelles par rapport aux mâles. Ce stock semble être utilisé par la femelle pour maintenir préférentiellement la gamma-carboxylation du facteur VII. La fixation de GGCX au facteur de la coagulation est réalisée à l'aide d'un propeptide présent dans toutes les protéines vitamine K dépendantes. L'affinité de GGCX pour les différentes protéines vitamine K dépendantes peut varier du simple au centuple en fonction de la séquence de ce propeptide. Chez l'homme, il a été montré que les propeptides des facteurs VII et X ont des affinités plus importantes pour GGCX que les autres propeptides des facteurs de la coagulation [165]. Aucune information n'est actuellement disponible concernant le rat. Nos résultats suggèrent que chez le rat c'est le facteur VII qui serait gamma-carboxylé prioritairement. Comme l'affinité d'un propeptide est déterminée par la séquence de celui-ci et que cette séquence est la même pour les mâles et les femelles, on peut penser que l'affinité de GGCX pour un propeptide ne dépend pas du sexe. Par conséquent, l'absence de plateau avant la décroissance de l'activité du facteur VII et la plus courte demi-vie des facteurs II et X chez le rat mâle sont certainement dus, après inhibition du cycle de régénération de la vitamine K, à l'absence de cofacteur pour GGCX, alors qu'un stock de vitamine K permettrait à la femelle de maintenir la gamma-carboxylation du facteur VII et dans une moindre mesure celle des facteurs II et X durant quelques heures après l'administration de la diféthialone.

En conclusion, la tolérance des rats femelles aux AVK est due à l'activité basale et à la demi-vie de ses facteurs vitamine K dépendants. À l'avenir il serait intéressant d'étudier les raisons des différences d'activité entre les facteurs de la coagulation des mâles et des femelles. Un stock de vitamine K plus important chez la femelle pourrait expliquer cette différence. Il serait intéressant de découvrir comment le genre influe sur ce stock de vitamine K et sur l'efficacité de l'utilisation de la vitamine K. Une étude de Markussen et al. a montré que les rats femelles régénéraient plus efficacement leur coagulation à la suite d'une injection de vitamine K [110], ce qui laisse à penser qu'en plus d'un niveau de stockage différent, l'assimilation de la vitamine K serait elle aussi différente. L'expérience de Markussen ne

portant que sur des individus résistants, nous avons réalisé une expérience préliminaire afin de confirmer cette observation sur des individus sensibles et de préparer les futurs protocoles (résultats non publiés). La Figure 22 montre l'évolution du facteur VII lors de cette régénération. Bien que ce ne soit qu'une expérience préliminaire, une différence entre les sexes dans la régénération du facteur VII de la coagulation, après administration de vitamine K, est déjà remarquable. Ce qui semble confirmer les résultats de Markussen.

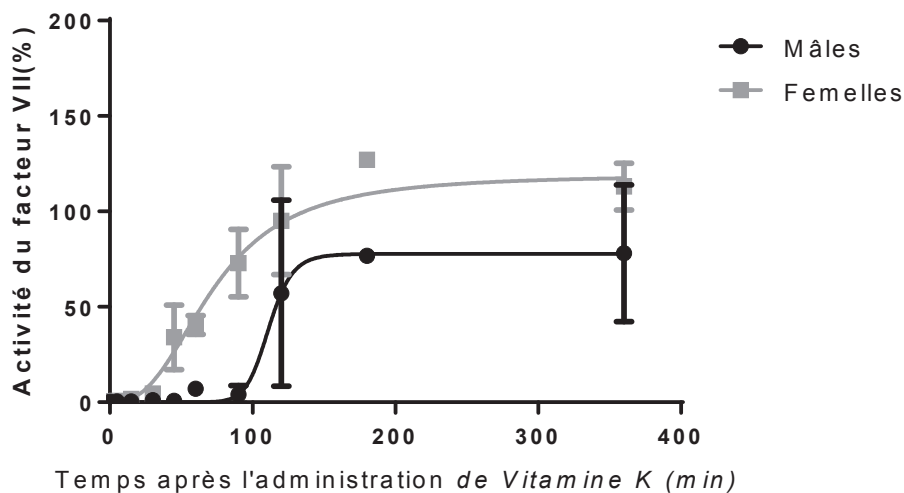


Figure 22 : Évolution de l'activité du facteur VII sur des rats ayant reçu une dose létale de diféthialone puis 48h après une dose de vitamine K.

Afin de comprendre cette différence dans l'efficacité d'action de la vitamine K entre les sexes, il pourrait être intéressant de se pencher sur le devenir de la vitamine K alimentaire dans le corps. En effet, dans les tissus les profils de vitamine K (proportion de phylloquinone et des différentes ménaquinones) sont différents entre les mâles et les femelles rat ou souris [70, 82]. Or, une seule ménaquinone est aujourd'hui décrite comme pouvant être synthétisée à partir de la phylloquinone par les mammifères, la MK-4. Ce qui implique que les différences observées sur les autres ménaquinones seraient dues à l'action du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal étant en partie influencé par le genre il pourrait être à l'origine des différences de profil de vitamines K [121]. Ces différences de profil pourraient jouer un rôle sur l'efficacité de la régénération de ces vitamines K et sur l'efficacité de la gamma-carboxylation. Si ce lien entre le microbiote et le profil tissulaire en vitamine K est confirmé, cela pourrait avoir des applications médicales. En effet, au vu des nombreuses fonctions physiologiques où les vitamines K interviennent, des modifications de la flore intestinale

impliquée dans la synthèse des ménaquinones pourraient expliquer des prédispositions à certaines maladies [89]. Plus particulièrement, il pourrait y avoir un lien entre le profil des ménaquinones et le syndrome métabolique [39].

V.5 ETUDE DES OPPORTUNITES DE NOUVEAUX AVK

Dans notre recherche de nouveaux AVK pouvant répondre aux critères recherchés d'efficacité et de faible impact écologique, nous nous sommes intéressés à la fêrule. Une plante commune du pourtour méditerranéen qui est réputée pour provoquer des hémorragies chez les ruminants qui la mangent. Cependant, dans la littérature deux chémotypes de la fêrule sont décrits sans qu'il soit possible de les distinguer, hormis par analyse chimique. Notre travail a eu deux objectifs : caractériser l'activité anti-vitamine K des molécules produites par la plante et déterminer les paramètres permettant d'expliquer les deux chémotypes.

Pour le premier objectif, les deux composés suspectés d'être des anti-vitamines K, le féruléol et la ferprénine ont été synthétisés et leur pouvoir inhibiteur de l'enzyme VKORC1 a été caractérisé sur des microsomes de foie. Cette étude a permis de confirmer que ces deux molécules sont des inhibiteurs de VKORC1, ce qui était, jusqu'à présent, fortement suspecté sans avoir été démontré. L'étude des constantes d'inhibition permet de comparer ces molécules aux autres AVK. Ainsi il est remarquable que la ferprénine a un faible pouvoir inhibiteur, avec des K_i jusqu'à 10 fois supérieures à celles obtenues avec la warfarine. Ce faible pouvoir anti-vitamine K corrobore une précédente étude *in vivo* qui montre que l'action hémorragique de la ferprénine ne s'obtient chez le rat qu'après administration de forte dose de la molécule [11]. À l'inverse, le féruléol possède une constante d'inhibition du même ordre de grandeur que celle des AVK de seconde génération (Difethialone, difénacoum) pour les microsomes de rat [77]. Ainsi, il semble que ce soit le féruléol qui soit le principal responsable de la toxicité de la fêrule. Ce résultat confirme celui d'une précédente étude qui avait choisi le féruléol pour distinguer les deux chémotype de la grande fêrule [150]. Cependant, il est à présent nécessaire de déterminer les paramètres pouvant favoriser l'un ou l'autre de ces chémotypes.

Pour étudier les paramètres pouvant favoriser l'un ou l'autre de ces chémotypes, nous avons analysé des fêrules de plusieurs variétés, venant de plusieurs endroits et à différent moment de l'année. Cela nous a permis de cartographier la répartition des variétés fêrule dans le sud de la France ainsi que leur concentration en ferprénine, féruléol A et féruléol B. En effet, lors de nos analyses nous avons découvert que le féruléol est présent sous la forme de

deux isomères que nous avons nommés féruléol A et féruléol B. Le féruléol B et le A possèdent en LC-MSMS le même ion moléculaire et la même fragmentation, mais ils ont des temps de rétention différents. Une isomérisation de type cis/trans (ou E/Z) dans la chaîne latérale du féruléol peut très probablement expliquer ce phénomène. La carte représentée dans la Figure 23, montre que les variétés de férule sont réparties différemment dans le sud de la France et que leur concentration en molécules anti-vitamines K diffère aussi. Cependant pour la problématique de différencier les deux chémotypes ce n'est la différence de variété qui compte. En effet, les variétés sont distinguables anatomiquement. Or, les chémotypes ont, tous les deux, été décrits chez *Ferula communis* var. *communis*, le reste de nos analyses est concentrée sur cette variété. On peut remarquer la présence de ces deux chémotypes sur la carte (Figure 26B). Notamment les férules de Corse semblent être plutôt du chémotype non toxique à l'inverse des férules du continent qui sont plutôt toxiques.

Cependant pour notre analyse il serait difficile de comparer les férules de Corse et celles du continent. En effet, entre les deux localisations de nombreux paramètres difficilement évaluable, tels que l'hygrométrie, peuvent modifier le chémotype. Pour cette raison, nous avons réduit la zone d'analyse au département du Var. Nous avons montré que le principal paramètre qui détermine la concentration en féruléol A est la période de l'année. Le mois de juin étant le plus propice à la production de féruléol A. Cependant, le nombre d'échantillons disponibles et leur faible diversité ne nous a pas permis de conclure sur l'importance de la nature du sol. Mais, à la vue de l'importance du sol sur la concentration des férules en ferprénine, il est envisageable que la nature du sol ait aussi une importance sur la concentration en féruléol A. A l'avenir, il sera intéressant d'étudier plus précisément l'impact du sol sur la concentration en féruléol A et de caractériser la forme chimique du féruléol B. En effet, la connaissance de la forme chimique du féruléol B nous permettrait de mieux comprendre son rôle et son rapport avec le féruléol A. Nos résultats semblent montrer que le féruléol A et le féruléol B ne sont pas présents au même moment de l'année. De plus, cela rendrait possible la synthèse du féruléol B et, par conséquent, de tester son pouvoir inhibiteur de VKORC1.

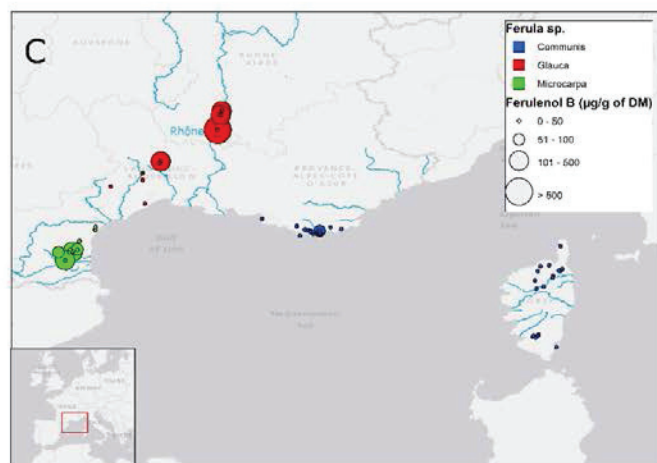
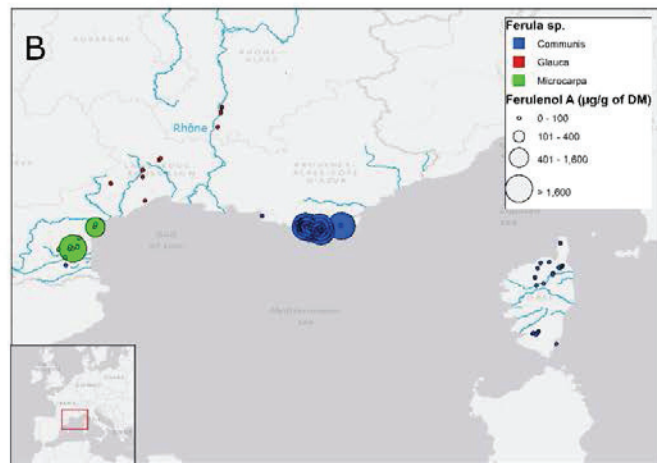
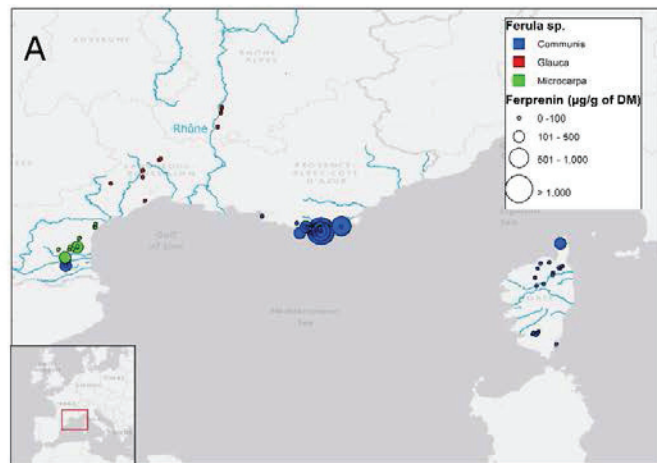


Figure 23 : Carte de la répartition des différentes variétés de férule et leur concentration en composés anti-vitamines K.

De nombreuses questions restent à explorer avant de savoir si les produits de la fêrule peuvent être utilisés et apporter une valeur ajoutée dans la lutte contre les rongeurs. Une autre opportunité de nouveaux AVK a été explorée.

Les AVK de seconde génération, actuellement commercialisés à des fins de lutte contre les rongeurs, sont présentés sous des formes où les deux diastéréoisomères sont présents. Cependant, pour chaque molécule l'un des diastéréoisomères est privilégié : La forme *cis* représente 50 à 80% du flocoumafène, du brodifacoum ou du difénacoum présent dans les appâts, de même que pour la forme *cis* de la diféthialone qui est la forme dominante présente dans les appâts (plus de 70%). À l'inverse c'est la forme *trans* qui est majoritaire pour la bromadiolone. Aucune explication n'a été publiée pour justifier le fait de privilégier un diastéréoisomère plutôt que l'autre. Cependant, il est possible de supposer que lors du développement des appâts, où les tests d'efficacité se faisaient suite à l'administration d'une dose unique d'AVK, les compositions contenant plus du diastéréoisomère le plus rémanent aient été privilégiées, car elles étaient, en apparence, plus efficaces. Cependant, cette technique d'étude de l'efficacité des AVK n'est pas représentative du terrain. En effet, sur le terrain, les rats sont réputés pour manger de façon régulière et aux mêmes endroits. Ainsi, si les appâts sont bien placés, les rats ingéreront l'AVK en plusieurs fois, et non en une.

Notre étude a pour but de : (i) déterminer si les activités inhibitrices de deux diastéréoisomères d'un même AVK sont équivalentes ; (ii) déterminer si les demi-vies de deux diastéréoisomères d'un même AVK sont différentes ; (iii) confirmer les résultats obtenus dans un test de mortalité et une étude des résidus sur les cadavres des rats.

La détermination, sur microsomes de foie de rats, des constantes d'inhibition n'a pas mis en évidence de différence significative entre la constante de la forme *cis* et celle de la forme *trans* d'un même AVK. Ainsi, *in vitro*, les deux forment d'un même AVK semblent avoir une efficacité équivalente.

Pour étudier la demi-vie des diastéréoisomères, chacune des molécules est administrée par voie orale à des rats à une dose de 3mg/kg. Cette dose étant létale, de la vitamine K₁ (5mg/kg) est administrée quotidiennement par voie sous-cutanée pour éviter la mort prématurée des animaux et pouvoir obtenir suffisamment de points pour déterminer convenablement la demi-vie des molécules. Pour l'ensemble des molécules, la demi-vie des

deux diastéréoisomères est significativement différente (les demi-vies sont rappelées dans le Tableau XI). Ces résultats confirment notre supposition : l'isomère ayant la demi-vie la plus longue est favorisé dans la composition des AVK du commerce. Il est nécessaire de confirmer dans un test d'efficacité *in vivo* que l'isomère ayant la demi-vie la plus courte à la même efficacité et une plus faible rémanence que celui avec une demi-vie plus longue.

Tableau XI : Demi-vie des différents isomères d'AVK de seconde génération après une administration unique par voie orale de 3mg/kg.

Molécule	t _{1/2} (h) [95% IC]	P
Difénacoum cis	78.33 [64.66-99.33]	0.0044
Difénacoum trans	24.18 [14.67-68.56]	
Brodifacoum cis	120.82 [110.74-732.89]	<0.0001
Brodifacoum trans	68.73 [57.28-85.84]	
Flocoumafène cis	76.73 [60.48-104.91]	<0.0001
Flocoumafène trans	177.45 [145.13-228.31]	
Bromadiolone cis	26.89 [19.65-42.55]	<0.0001
Bromadiolone trans	75.62 [64.72-90.96]	
Diféthialone cis	71.60 [44.52-61.78]	0.0310
Diféthialone trans	52.93 [46.36-61.67]	

Les tests d'efficacité actuels n'utilisent plus une administration unique d'AVK, méthodes peu représentatives du terrain et favorisant les molécules rémanentes, mais un remplacement de la nourriture des rats par des appâts pendant quatre jours. Ainsi, de façon plus représentative du terrain, les rats mangent les appâts durant plusieurs jours. La mortalité est évaluée chaque jour dans le but de déterminer quelle molécule est la plus efficace. En plus du test de mortalité traditionnel, nous avons réalisé une analyse de résidu sur les dépouilles afin de comparer la rémanence des molécules. Seuls les diastéréoisomères de la diféthialone et de la bromadiolone ont été testés. Quatre groupes de 5 ou 6 rats ont été constitués, chacun des groupes a eu accès durant quatre jours à des appâts dans lesquels été présent un des quatre isomères étudiés. Pour chacun des deux AVK, la bromadiolone et la diféthialone, l'efficacité était équivalente, quel que soit l'isomère. Cependant, concernant les résidus une différence significative n'a été mise en évidence que pour les isomères de la bromadiolone. En effet, la concentration totale en résidus de bromadiolone dans le corps des rats était quatre fois plus

importante lorsque l'appât mis à disposition contenait de la bromadiolone *trans* que lorsqu'il contenait de la bromadiolone *cis*.

Ainsi, augmenter la part de bromadiolone *cis* dans les formes commerciales de rodenticides pourrait permettre de diminuer les résidus d'AVK et donc de réduire le risque de contamination secondaire, sans altérer l'efficacité de la molécule. De plus, il est intéressant de constater que la bromadiolone est efficace sur les mutations du gène VKORC1 décrites chez le rat (Hodroge et al., 2011).

Pour conclure sur la recherche de nouveaux AVK, nous avons étudié deux opportunités, des AVK d'origine naturelle et des diastéréoisomères de molécules existantes. Notre étude des AVK produits par la grande fêrule, a permis de confirmer leur mécanisme d'action, et les paramètres favorisant leur présence dans les plants sauvages de fêrules. Si ces éléments n'apportent pas, à court terme, d'informations suffisantes quant à la possible utilisation des AVK de la fêrule dans la lutte contre les rongeurs, ils permettent de mieux comprendre la toxicité de cette plante. Concernant l'étude des isomères des AVK de seconde génération, nous avons montré que l'utilisation d'un mélange différent entre les diastéréoisomères de certains AVK pouvait diminuer sa rémanence sans altérer son efficacité, ce qui est un enjeu majeur pour développer des rodenticides plus respectueux de l'environnement.

VI. CONCLUSION

Après avoir brièvement présenté les connaissances bibliographiques actuelles portant sur la coagulation et les anticoagulants anti-vitamines K (AVK), cette thèse présente les travaux menés dans l'objectif de déterminer l'origine de la tolérance du rat femelle aux AVK et d'étudier de nouvelles opportunités d'AVK utilisable dans la lutte contre les rongeurs.

Depuis une trentaine d'années, il a été remarqué que les rats femelles étaient moins sensibles aux AVK que les rats mâles. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence : (i) une activité microsomale responsable de la régénération de la vitamine K plus efficace chez les femelles; (ii) une élimination plus rapide des AVK par les rats femelles; (iii) des concentrations basales et des demi-vies des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants plus élevées chez les femelles.

Les activités microsomales responsables de la régénération de la vitamine K des rats mâles et femelles ont été comparées, en présence ou non d'un AVK, sans mettre en évidence de différence significative.

Dans un second temps, la pharmacocinétique d'un AVK, la diféthialone, a été explorée dans des rats des deux sexes. Les concentrations maximales et les aires sous la courbe des concentrations hépatiques étaient significativement supérieures pour les rats femelles comparés aux rats mâles. Ce qui exclut l'hypothèse d'une meilleure élimination des AVK pour expliquer la différence de sensibilité.

Afin d'explorer la dernière hypothèse sur l'origine de la différence de sensibilité, différentes méthodes d'exploration de la coagulation (temps de coagulation, concentrations des facteurs de la coagulation, test de génération thrombine et thromboélastométrie) ont été comparées dans une situation d'intoxication aux AVK chez le rat. Ce travail a permis la mise en place du test de génération thrombine chez le rat et de déterminer les paramètres les plus sensibles à l'arrêt du cycle de la régénération de la vitamine K chez le rat.

Enfin, les cinétiques de déplétion, à la suite de l'administration d'un AVK, des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants, puis celle de leur régénération, après administration de vitamine K, ont été étudiées chez des rats des deux genres. Les résultats mettent en évidence des différences significatives concernant les niveaux basaux et les cinétiques d'évolution certains facteurs de la coagulation, pouvant expliquer la plus faible sensibilité des femelles aux AVK.

Les différences de sensibilité entre les rats mâles et femelles ainsi que l'émergence de résistances aux AVK nous poussent à réfléchir sur l'utilisation des rodenticides et à explorer de nouvelles opportunités d'AVK plus efficaces sur les rongeurs et moins rémanents afin de limiter les intoxications secondaires. Dans ce manuscrit nous avons exploré deux opportunités de nouveaux AVK : Les AVK contenus dans une plante méditerranéenne et les diastéréoisomères des AVK de seconde génération déjà existants. Nous avons caractérisé le pouvoir inhibiteur du féruléol et de la ferprénine, les AVK contenus dans la férule, sur VKORC1, ainsi nous avons prouvé que ce sont bien des AVK. De plus, nous avons déterminé les paramètres influençant leur concentration dans la plante à l'état sauvage. Ce travail nous a permis de mieux appréhender la différence entre les deux chémotypes (toxique ou non) de la férule et de découvrir que la férule contient un isomère du féruléol que nous avons appelé féruléol B. Cependant nous n'avons pas encore déterminé la structure chimique du féruléol B, élément essentiel pour déterminer ses propriétés et pouvoir tester sa capacité à inhiber VKORC1.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. - ABOHELAIKA S., WYNNE H., AVERY P., ROBINSON B., KESTEVEN P., KAMALI F.: Impact of age on long-term anticoagulation and how gender and monitoring setting affect it: implications for decision making and patient management [Internet]. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2016, 1-8.
2. - AFSHARI A., WIKKELSØ A., BROK J., MØLLER A.M., WETTERSLEV J.: Thrombelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemotherapy versus usual care in patients with massive transfusion [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd, 2011
3. - AGENO W., GALLUS A.S., WITTKOWSKY A., CROWTHER M., HYLEK E.M., PALARETI G.: Oral Anticoagulant Therapy [Internet]. *Chest*, 2012, **141**, e44S-e88S.
4. - AHMAD E., HUSSAIN I., BROOKS J.E.: Losses of stored foods due to rats at grain markets in Pakistan [Internet]. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 1995, **36**, 125-133.
5. - AITHAL G.P., DAY C.P., KESTEVEN P.J., DALY A.K.: Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications [Internet]. *Lancet*, 1999, **353**, 717-719.
6. - AKABERI M., IRANSHAHY M., IRANSHAHI M.: Review of the traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of giant fennel (*Ferula communis* L. subsp. *communis*). [Internet]. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 2015, **18**, 1050-62.
7. - ALSTAD A.D., CASPER H.H., JOHNSON L.J.: Vitamin K treatment of sweet clover poisoning in calves [Internet]. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1985, **187**, 729-731.
8. - ANDREWS R.K., BERNDT M.C.: Platelet physiology and thrombosis [Internet]. *Thromb. Res.*, 2004, **114**, 447-453.
9. - ANDREWS T.C., PETERSON D.W., DOEPPENSCHMIDT D., FOSTER J.S., LUCCA M.J., DEERING J.A., LAVEAU P.J.: Complications of warfarin therapy monitored by the international normalized ratio versus the prothrombin time ratio [Internet]. *Clin. Cardiol.*, 1995, **18**, 80-82.

10. - ANNIS D.S., MA H., BALAS D.M., KUMFER K.T., SANDBO N., POTTS G.K., COON J.J., MOSHER D.F., TAKESHITA S., KIKUNO R., TEZUKA K., AMANN E., SKONIER J., NEUBAUER M., MADISEN L., BENNETT K., PLOWMAN G., PURCHIO A., COUTU D., WU J., MONETTE A., RIVARD G., BLOSTEIN M., GALIPEAU J., MANN K., NESHEIM M., CHURCH W., HALEY P., KRISHNASWAMY S., BERKNER K., HORIUCHI K., AMIZUKA N., TAKESHITA S., TAKAMATSU H., KATSUURA M., OZAWA H., DOLIANA R., BOT S., BONALDO P., COLOMBATTI A., COLOMBATTI A., DOLIANA R., BOT S., CANTON A., MONGIAT M., MUNGIGUERRA G., ZINN K., MCALLISTER L., GOODMAN C., YUYAMA N., DAVIES D., AKAIWA M., MATSUI K., HAMASAKI Y., SUMINAMI Y., TAKAYAMA G., ARIMA K., KANAJI T., TODA S., TANAKA H., SHOJI S., HAYASHI N., YOSHIMOTO T., IZUHARA K., MATSUI K., TANAKA T., NAKANISHI K., WOODRUFF P., BOUSHEY H., DOLGANOV G., BARKER C., YANG Y., DONNELLY S., SIDHU S., YUAN S., INNES A., KERR S., WOODRUFF P., HOU L., NAIK P., BOZYK P., BENTLEY J., POPOVA A., BIRCH C., WILKE C., BILLINGS P., HERRICK D., HOWARD P., KUCICH U., ENGELSBERG B., ROSENBLOOM J., SUN Y., JIN D., CAMIRE R., STAFFORD D., BROWN M., STENBERG L., PERSSON U., STENFLO J., et al: Absence of Vitamin K-Dependent γ -Carboxylation in Human Periostin Extracted from Fibrotic Lung or Secreted from a Cell Line Engineered to Optimize γ -Carboxylation [Internet]. *PLoS One*, 2015, **10**, e0135374.

11. - ARAGNO M., TAGLIAPIETRA S., NANO G.M., UGAZIO G.: Experimental studies on the toxicity of *Ferula communis* in the rat. [Internet]. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1988, **59**, 399-402.

12. - ARAL H., USTA M., CILINGIRTURK A.M., INAL B.B., BILGI P.T., GUVENEN G.: Verifying reference intervals for coagulation tests by using stored data [Internet]. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2011, **71**, 647-652.

13. - BAUMANN KREUZIGER L.M., DATTA Y.H., JOHNSON A.D., ZANTEK N.D., SHANLEY R., REDING M.T.: Monitoring anticoagulation in patients with an unreliable prothrombin time/international normalized ratio: factor II versus chromogenic factor X testing. [Internet]. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 2014, **25**, 232-6.

14. - BEGENT L.A., HILL A.P., STEVENTON G.B., HUTT A.J., PALLISTER C.J., COWELL D.C.: Characterization and purification of the vitamin K1 2,3 epoxide reductase system from rat liver [Internet]. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001, **53**, 481-486.

15. - BÉGUIN S., KUMAR R.: Thrombin, fibrin and platelets: a resonance loop in which von Willebrand factor is a necessary link [Internet]. *Thromb. Haemost.*, 1997, **78**, 590-594.
16. - BENTLEY R., MEGANATHAN R.: Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. [Internet]. *Microbiol. Rev.*, 1982, **46**, 241-280.
17. - BENZAKOUR O., GELY A., LARA R., CORONAS V.: Fonctions nouvelles de Gas-6 et de la protéine S [Internet]. *médecine/sciences*, 2007, **23**, 826-833.
18. - BLACK D.J., KUNZE K.L., WIENKERS L.C., GIDAL B.E., SEATON T.L., MCDONNELL N.D., EVANS J.S., BAUWENS J.E., TRAGER W.F.: Warfarin-fluconazole. II. A metabolically based drug interaction: in vivo studies. *Drug Metab. Dispos.*, 1996, **24**, 422-428.
19. - BORN G.V.R., CROSS M.J.: The aggregation of blood platelets [Internet]. *J. Physiol.*, 1963, **168**, 178-195.
20. - BOSKEY A., GADALETA S., GUNDBERG C., DOTY S., DUCY P., KARSENTY G.: Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, 1998, **23**, 187-196.
21. - BRAUD S., BON C., WISNER A.: Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, 2000, **82**, 851-859.
22. - BROOKS J.E., FIEDLER L.A.: Vertebrate Pests: Damage on stored foods [Internet].
23. - BRYCKAERT M., ROSA J.-P., DENIS C. V., LENTING P.J.: Of von Willebrand factor and platelets [Internet]. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015, **72**, 307-326.
24. - BURDGE G.C., SLATER-JEFFERIES J.L., GRANT R.A., CHUNG W.-S., WEST A.L., LILLYCROP K.A., HANSON M.A., CALDER P.C.: Sex, but not maternal protein or folic acid intake, determines the fatty acid composition of hepatic phospholipids, but not of triacylglycerol, in adult rats. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, 2008, **78**, 73-79.
25. - CARLSON B.: Declaring War on Warfarin Mis dosing [Internet]. *Biotechnol. Healthc.*, 2008, **5**, 54-55.
26. - CASTILLO E., PRIOTTO J., AMBROSIO A.M., PROVENSAL M.C., PINI N., MORALES M.A., STEINMANN A., POLOP J.J.: Commensal and wild rodents in an urban area of Argentina [Internet]. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 2003, **52**, 135-141.

27. - CASTOLDI E., BRUGGE J.M., NICOLAES G.A.F., GIRELLI D., TANS G., ROSING J.: Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations [Internet]. *Blood*, 2004, **103**, 4173-4179.
28. - CASTOLDI E., ROSING J.: Thrombin generation tests. *Thromb. Res.*, 2011, **127**, S21-S25.
29. - CHATROU M.L.L., WINCKERS K., HACKENG T.M., REUTELINGSPERGER C.P., SCHURGERS L.J.: Vascular calcification: The price to pay for anticoagulation therapy with vitamin K-antagonists. *Blood Rev.*, 2012, **26**, 155-166.
30. - CHILDS C.E., ROMEU-NADAL M., BURDGE G.C., CALDER P.C.: The Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Hepatic and Plasma Lipids Differ by Both Sex and Dietary Fat Intake in Rats [Internet]. *J. Nutr.*, 2010, **140**, 245-250.
31. - CHILET-ROSELL E.: Gender bias in clinical research, pharmaceutical marketing, and the prescription of drugs [Internet]. *Glob. Health Action*, 2014, **7**, 25484.
32. - CHU P.-H., HUANG T.-Y., WILLIAMS J., STAFFORD D.W.: Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂ [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 19308-19313.
33. - CINES D.B., POLLAK E.S., BUCK C.A., LOSCALZO J., ZIMMERMAN G.A., MCEVER R.P., POBER J.S., WICK T.M., KONKLE B.A., SCHWARTZ B.S., BARNATHAN E.S., MCCRAE K.R., HUG B.A., SCHMIDT A.-M., STERN D.M.: Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders [Internet]. *Blood*, 1998, **91**, 3527-3561.
34. - CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE: Platelet function testing by aggregometry. Approved guideline. 2008,
35. - CONLY J.M., STEIN K.: The production of menaquinones (vitamin K₂) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis [Internet]. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1992, **16**, 307-343.

36. - CORTICELLI B., DEIANA S., PALMAS G.: [Protective antihemorrhagic effects of vitamin K-1 in poisoning by *Ferula communis*]. [Internet]. *Boll. della Soc. Ital. di Biol. Sper.*, 1957, **33**, 629-31.
37. - COUTU D.L., WU J.H., MONETTE A., RIVARD G.-E., BLOSTEIN M.D., GALIPEAU J.: Periostin, a Member of a Novel Family of Vitamin K-dependent Proteins, Is Expressed by Mesenchymal Stromal Cells [Internet]. *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 17991-18001.
38. - DAM H., GLAVIND J.: Vitamin K in the plant [Internet]. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 485-487.
39. - DAM V., DALMEIJER G.W., VERMEER C., DRUMMEN N.E., KNAPEN M.H., VAN DER SCHOUW Y.T., BEULENS J.W.: Association Between Vitamin K and the Metabolic Syndrome: A 10-Year Follow-Up Study in Adults [Internet]. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015, **100**, 2472-2479.
40. - DRAKE T.A., MORRISSEY J.H., EDGINGTON T.S.: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. [Internet]. *Am. J. Pathol.*, 1989, **134**, 1087-1097.
41. - DUCY P., DESBOIS C., BOYCE B., PINERO G., STORY B., DUNSTAN C., SMITH E., BONADIO J., GOLDSTEIN S., GUNDBERG C., BRADLEY A., KARSENTY G.: Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice [Internet]. *Nature*, 1996, **382**, 448-452.
42. - DUNHAM C., RABEL C., HILEMAN B.M., SCHIRALDI J., CHANCE E.A., SHIMA M.T., MOLINAR A.A., HOFFMAN D.A.: TEG[®] and RapidTEG[®] are unreliable for detecting warfarin-coagulopathy: a prospective cohort study [Internet]. *Thromb. J.*, 2014, **12**, 4.
43. - EDSON K.Z., PRASAD B., UNADKAT J.D., SUHARA Y., OKANO T., GUENGERICH F.P., RETTIE A.E.: Cytochrome P450-Dependent Catabolism of Vitamin K: ω -Hydroxylation Catalyzed by Human CYP4F2 and CYP4F11 [Internet]. *Biochemistry*, 2013, **52**, 8276-8285.
44. - EIGENBROT C.: Structure, Function, and Activation of Coagulation Factor VII. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2002, **3**, 287-299.

45. - ERICKSON W.A., URBAN D.J.: Potential risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: a comparative approach [Internet]. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances Washington, DC, 2004.

46. - ESPITIA O., FOUASSIER M.: Le test de génération de thrombine [Internet]. *La Rev. Médecine Interne*, 2015, **36**, 690-693.

47. - FARIA M.T. de, CALDERWOOD M.S., ATHANAZIO D.A., MCBRIDE A.J.A., HARTSKEERL R.A., PEREIRA M.M., KO A.I., REIS M.G.: Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.*, 2008, **108**, 1-5.

48. - FASCO M.J., PREUSCH P.C., HILDEBRANDT E., SUTTIE J.W.: Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin-resistant rats. [Internet]. *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, 4372-4380.

49. - FAVALORO E.J., SOLTANI S., MCDONALD J., GREZCHNIK E., EASTON L.: Cross-laboratory audit of normal reference ranges and assessment of ABO blood group, gender and age on detected levels of plasma coagulation factors [Internet]. *Blood Coagul. Fibrinolysis An Int. J. Haemost. Thromb.*, 2005, **16**, 597-605.

50. - FEDERICI A.B.: The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues [Internet]. *Haematologica*, 2003, **88**, EREP02.

51. - FENG A.Y.T., HIMSWORTH C.G.: The secret life of the city rat: a review of the ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) [Internet]. *Urban Ecosyst.*, 2013, **17**, 149-162.

52. - FERLAND G.: The Discovery of Vitamin K and Its Clinical Applications [Internet]. *Ann. Nutr. Metab.*, 2012, **61**, 213-218.

53. - FERRON M., HINOI E., KARSENTY G., DUCY P.: Osteocalcin differentially regulates cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**, 5266-5270.

54. - FLECK R.A., RAO L.V.M., RAPAPORT S.I., VARKI N.: Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody [Internet]. *Thromb. Res.*, 1990, **59**, 421-437.

55. - FRANZ T., RUGGEBERG S., HORN P., LI X., VAJKOCZY P.: Detection of a γ -Carboxy-Glutamate as Novel Post-Translational Modification of Human Transthyretin [Internet]. *Protein Pept. Lett.*, 2008, **15**, 43-46.

56. - FRASER J.D., OTAWARA Y., PRICE P.A.: 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates the synthesis of matrix γ -carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 911-916.

57. - FUJIKAWA K., TITANI K., DAVIE E.W.: Activation of bovine factor X (Stuart factor): conversion of factor X α to factor X β [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, **72**, 3359–3363.

58. - GAMELIN L., HARRY P.: Rodenticides [Internet]. *EMC - Toxicol.*, 2005, **2**, 89-97.

59. - GARCIA D., REGAN S., CROWTHER M., HUGHES R.A., HYLEK E.M.: Warfarin Maintenance Dosing Patterns in Clinical Practice [Internet]. *Chest*, 2005, **127**, 2049-2056.

60. - GARCIA V. V., COPPOLA R., MANNUCCI P.M.: The role of the spleen in regulating the plasma levels of factor VIII-- von Willebrand's factor after DDAVP [Internet]. *Blood*, 1982, **60**, 1402-1406.

61. - GEORGE J. BROZE M.D.J.: Tissue Factor Pathway Inhibitor and the Revised Theory of Coagulation [Internet]. *Annu. Rev. Med.*, 1995, **46**, 103-112.

62. - GIJSBERS B.L., JIE K.S., VERMEER C.: Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers [Internet]. *Br. J. Nutr.*, 1996, **76**, 223-229.

63. - GILL J.E., KERINS G.M., LANGTON S.D., MACNICOLL A.D.: Blood-Clotting Response Test for Bromadiolone Resistance in Norway Rats [Internet]. *J. Wildl. Manage.*, 1994, **58**, 454-461.

64. - GODBILLON J., RICHARD J., GERARDIN A., MEINERTZ T., KASPER W., JÄHNCHEN E., JAHNCHEN E.: Pharmacokinetics of the enantiomers of acenocoumarol in man. [Internet]. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1981, **12**, 621–629.

65. - GOPLEN B.P.: Sweetclover Production and Agronomy [Internet]. *Can. Vet. J.*, 1980, **21**, 149-151.
66. - HAMILTON D.W.: Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. [Internet]. *J. Cell Commun. Signal.*, 2008, **2**, 9-17.
67. - HAMMED A., MATAGRIN B., SPOHN G., PROUILLAC C., BENOIT E., LATTARD V.: VKORC1L1, an Enzyme Rescuing the Vitamin K 2,3-Epoxy Reductase Activity in Some Extrahepatic Tissues during Anticoagulation Therapy [Internet]. *J. Biol. Chem.*, 2013, **288**, 28733-28742.
68. - HAMMICHE V., MERAD R., AZZOUZ M.: Férule commune [Internet]. Springer Paris, 2013, 123-127.
69. - HARAUCHI T., TAKANO K., MATSUURA M., YOSHIZAKI T.: Liver and Plasma Levels of Descarboxyprothrombin (PIVKA II) in Vitamin K Deficiency in Rats [Internet]. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1986, **40**, 491-499.
70. - HARSHMAN S.G., FU X., KARL J.P., BARGER K., LAMON-FAVA S., KULIOPULOS A., GREENBERG A.S., SMITH D., SHEN X., BOOTH S.L.: Tissue Concentrations of Vitamin K and Expression of Key Enzymes of Vitamin K Metabolism Are Influenced by Sex and Diet but Not Housing in C57Bl6 Mice [Internet]. *J. Nutr.*, 2016, **146**, jn233130.
71. - HARTER K., LEVINE M., HENDERSON S.O.: Anticoagulation Drug Therapy: A Review [Internet]. *West. J. Emerg. Med.*, 2015, **16**, 11-17.
72. - HARTERT H.: Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren [Internet]. *Klin. Wochenschr.*, 1948, **26**, 577-583.
73. - HAUSCHKA P. V., LIAN J.B., COLE D.E., GUNDBERG C.M.: Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. [Internet]. *Physiol. Rev.*, 1989, **69**, 990-1047.
74. - HEEMSKERK J.W.M., BEVERS E.M., LINDHOUT T.: Platelet activation and blood coagulation [Internet]. *Thromb. Haemost.*, 2002, **88**, 186-193.
75. - HERTZBERG M.: Biochemistry of factor X [Internet]. *Blood Rev.*, 1994, **8**, 56-62.

76. - HIRSH J., FUSTER V., ANSELL J., HALPERIN J.L.: American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Guide to Warfarin Therapy [Internet]. *Circulation*, 2003, **107**, 1692-1711.
77. - HODROGE A., LONGIN-SAUVAGEON C., FOUREL I., BENOIT E., LATTARD V.: Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants [Internet]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011, **515**, 14-20.
78. - HOLLANDER D.: Vitamin K1 absorption by everted intestinal sacs of the rat [Internet]. *Am. J. Physiol.*, 1973, **225**, 360-364.
79. - HOLMSEN H., ØSTVOLD A.-C., JAMES DAY H.: Behaviour of endogenous and newly absorbed serotonin in the platelet release reaction [Internet]. *Biochem. Pharmacol.*, 1973, **22**, 2599-2608.
80. - VAN HORN W.D.: Structural and functional insights into human vitamin K epoxide reductase and vitamin K epoxide reductase-like1 [Internet]. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2013, **48**, 357-372.
81. - HUBER A.M., DAVIDSON K.W., O'BRIEN-MORSE M.E., SADOWSKI J.A.: Gender differences in hepatic phylloquinone and menaquinones in the vitamin K-deficient and -supplemented rat [Internet]. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 1999, **1426**, 43-52.
82. - HUBER A.M., DAVIDSON K.W., O'BRIEN-MORSE M.E., SADOWSKI J.A.: Tissue phylloquinone and menaquinones in rats are affected by age and gender. [Internet]. *J. Nutr.*, 1999, **129**, 1039-44.
83. - HUEBNER C.F., LINK K.P.: Studies on the hemorrhagic sweet clover disease VI. the synthesis of the δ -diketone derived from the hemorrhagic agent through alkaline degradation [Internet]. *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 529-534.
84. - IQBAL J., HUSSAIN M.M.: Intestinal lipid absorption [Internet]. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, 2009, **296**, E1183-E1194.
85. - ISENSEE J., NOPPINGER P.R.: Sexually Dimorphic Gene Expression in Mammalian Somatic Tissue [Internet]. *Gen. Med.*, 2007, **4**, S75-S95.

86. - JAENECKE F., FRIEDRICH-EPLER B., PARTHIER C., STUBBS M.T.: Membrane Composition Influences the Activity of in Vitro Refolded Human Vitamin K Epoxide Reductase [Internet]. *Biochemistry*, 2015, **54**, 6454-6461.

87. - KAIN K., CARTER A. m., BAMFORD J. m., GRANT P. j., CATTO A. j.: Gender differences in coagulation and fibrinolysis in white subjects with acute ischemic stroke [Internet]. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, **1**, 390-392.

88. - KALAT J.W., ROZIN P.: « Learned safety » as a mechanism in long-delay taste-aversion learning in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 1973, **83**, 198-207.

89. - KARL J.P., FU X., WANG X., ZHAO Y., SHEN J., ZHANG C., WOLFE B.E., SALTZMAN E., ZHAO L., BOOTH S.L.: Fecal menaquinone profiles of overweight adults are associated with gut microbiota composition during a gut microbiota-targeted dietary intervention [Internet]. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2015, **102**, 84-93.

90. - KERINS G.M., MACNICOLL A.D.: Comparison of the half-lives and regeneration rates of blood clotting factors II, VII, and X in anticoagulant-resistant and susceptible Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.) [Internet]. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 1999, **122**, 307-316.

91. - KHANIN M.A., RAKOV D. V., KOGAN A.E.: Mathematical Model for the Blood Coagulation Prothrombin Time Test [Internet]. *Thromb. Res.*, 1998, **89**, 227-232.

92. - KIRLEY K., QATO D.M., KORNFIELD R., STAFFORD R.S., ALEXANDER G.C.: National Trends in Oral Anticoagulant Use in the United States, 2007 to 2011 [Internet]. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes*, 2012, **5**, 615-621.

93. - KOHN B., WEINGART C., GIGER U.: Haemorrhage in seven cats with suspected anticoagulant rodenticide intoxication. *J. Feline Med. Surg.*, 2003, **5**, 295-304.

94. - KOHN M.H., PELZ H.-J.J.: Genomic assignment of the warfarin resistance locus, *Rw*, in the rat [Internet]. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.*, 1999, **10**, 696–698.

95. - KRIZ N., RINDER C.S., RINDER H.M.: Physiology of Hemostasis: With Relevance to Current and Future Laboratory Testing. *Clin. Lab. Med.*, 2009, **29**, 159-174.

96. - LANCÉ M.D.: A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb. J.*, 2015, **13**.

97. - LANE S., AL-ZUBIEDI S., HATCH E., MATTHEWS I., JORGENSEN A.L., DELOUKAS P., DALY A.K., PARK B.K., AARONS L., OGUNGBENRO K., KAMALI F., HUGHES D., PIRMOHAMED M.: The population pharmacokinetics of R- and S-warfarin: effect of genetic and clinical factors. [Internet]. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2012, **73**, 66-76.

98. - LASSEUR R., LONGIN-SAUVAGEON C., VIDEMANN B., BILLERET M., BERNY P., BENOIT E.: Warfarin resistance in a French strain of rats [Internet]. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2006, **19**, 379-385.

99. - LEBLANC J.G., MILANI C., DE GIORI G.S., SESMA F., VAN SINDEREN D., VENTURA M.: Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective [Internet]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2013, **24**, 160-168.

100. - LECHNER D., WELTERMANN A.: Papers of the 4th Symposium on Hemostasis with Special Focus on Factor VIIa and Tissue Factor-Understanding the Molecular Mechanism Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thromb. Res.*, 2008, **122**, S47-S54.

101. - LECHNER D., WELTERMANN A.: Circulating tissue factor-exposing microparticles [Internet]. *Thromb. Res.*, 2008, **122**, S47-S54.

102. - LEE N.K., SOWA H., HINOI E., FERRON M., AHN J.D., CONFAVREUX C., DACQUIN R., MEE P.J., MCKEE M.D., JUNG D.Y., ZHANG Z., KIM J.K., MAUVAIS-JARVIS F., DUCY P., KARSENTY G.: Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*, 2007, **130**, 456-469.

103. - LEMINI C., JAIMEZ R., FRANCO Y.: Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice [Internet]. *Thromb. Res.*, 2007, **120**, 415-419.

104. - LINDH J.D., HOLM L., ANDERSSON M.L., RANE A.: Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements—a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2008, **65**, 365-375.

105. - LUDDINGTON R.J.: Thrombelastography/thromboelastometry [Internet]. *Clin. Lab. Haematol.*, 2005, **27**, 81-90.
106. - LUO G., DUCY P., MCKEE M.D., PINERO G.J., LOYER E., BEHRINGER R.R., KARSENTY G.: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein [Internet]. *Nature*, 1997, **386**, 78-81.
107. - MACFARLANE R.G., BIGGS R.: A Thrombin Generation Test. *J. Clin. Pathol.*, 1953, **6**, 3-8.
108. - MACKMAN N.: Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development [Internet]. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, **24**, 1015-1022.
109. - MACKMAN N.: The Role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis [Internet]. *Anesth. Analg.*, 2009, **108**, 1447-1452.
110. - MARKUSSEN M.D., HEIBERG A.-C., FREDHOLM M., KRISTENSEN M.: Characterization of bromadiolone resistance in a danish strain of Norway rats, *rattus norvegicus*, by hepatic gene expression profiling of genes involved in vitamin k-dependent γ -carboxylation [Internet]. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2007, **21**, 373-381.
111. - MARKUSSEN M.D., HEIBERG A.-C., FREDHOLM M., KRISTENSEN M.: Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: a possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance [Internet]. *Pest Manag. Sci.*, 2008, **64**, 239-248.
112. - MARMUR J.D., ROSSIKHINA M., GUHA A., FYFE B., FRIEDRICH V., MENDLOWITZ M., NEMERSON Y., TAUBMAN M.B.: Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. [Internet]. *J. Clin. Invest.*, 1993, **91**, 2253-2259.
113. - MARTIN-BOUYER G., LINH P.D., TUAN L.C., BARIN C., KHANH N.B., HOA D.Q., TOURNEAU J., GUERBOIS H., BINH T. V.: EPIDEMIC OF HAEMORRHAGIC DISEASE IN VIETNAMESE INFANTS CAUSED BY WARFARIN-CONTAMINATED TALCS [Internet]. *Lancet*, 1983, **321**, 230-232.
114. - MASYS D.R., BAJAJ S.P., RAPAPORT S.I.: Activation of human factor VII by activated factors IX and X [Internet]. *Blood*, 1982, **60**, 1143-1150.

115. - MATAGRIN B., HODROGE A., MONTAGUT-ROMANS A., ANDRU J., FOUREL I., BESSE S., BENOIT E., LATTARD V.: New insights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) – The catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explain the biological cost associated to mutations [Internet]. *FEBS Open Bio*, 2013, **3**, 144-150.
116. - MEDVED L., WEISEL J.W.: Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin [Internet]. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, **7**, 355-359.
117. - MEYER M.C., STRAUGHN A.B., MHATRE R.M., SHAH V.P., CHEN M., WILLIAMS R.L., LESKO L.J.: Variability in the Bioavailability of Phenytoin Capsules in Males and Females [Internet]. *Pharm. Res.*, 2001, **18**, 394-397.
118. - MIKAELSSON M.E.: The Role of Calcium in Coagulation and Anticoagulation. In: SIBINGA CTS, DAS PC, MANNUCCI PM, editor(s). . Springer US, 1991, 29-37.
119. - MIYOSHI I., PAUL L.K., STAHMANN M.A.: 3-substituted 4-hydroxycoumarin and process of making it. 1947,
120. - MOGIL J.S.: Perspective: Equality need not be painful [Internet]. *Nature*, 2016, **535**, S7-S7.
121. - MUELLER S., SAUNIER K., HANISCH C., NORIN E., ALM L., MIDTVEDT T., CRESCI A., SILVI S., ORPIANESI C., VERDENELLI M.C., CLAVEL T., KOEBNICK C., ZUNFT H.-J.F., DORE J., BLAUT M.: Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations in Relation to Age, Gender, and Country: a Cross-Sectional Study [Internet]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 1027-1033.
122. - MUGFORD C.A., KEDDERIS G.L.: Sex-Dependent Metabolism of Xenobiotics [Internet]. *Drug Metab. Rev.*, 1998, **30**, 441-498.
123. - MUMFORD A.D., FRELINGER A.L., GACHET C., GRESELE P., NORIS P., HARRISON P., MEZZANO D.: A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb. Haemost.*, 2015, **114**, 14-25.
124. - MYERS J.H., SIMBERLOFF D., KURIS A.M., CAREY J.R.: Eradication revisited: dealing with exotic species [Internet]. *Trends Ecol. Evol.*, 2000, **15**, 316-320.

125. - NAKAGAWA K., HIROTA Y., SAWADA N., YUGE N., WATANABE M., UCHINO Y., OKUDA N., SHIMOMURA Y., SUHARA Y., OKANO T.: Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme [Internet]. *Nature*, 2010, **468**, 117-121.
126. - NAZARI Z.E., IRANSHAHI M.: Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species [Internet]. *Phyther. Res.*, 2010, **25**.
127. - NICOLAES G.A.F., DAHLBÄCK B.: Factor V and Thrombotic Disease Description of a Janus-Faced Protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, **22**, 530-538.
128. - OKANO T., SHIMOMURA Y., YAMANE M., SUHARA Y., KAMA O., SUGIURA M., NAKAGAWA K.: Conversion of Phylloquinone (Vitamin K1) into Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Mice two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice [Internet]. *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 11270-11279.
129. - OURY F., SUMARA G., SUMARA O., FERRON M., CHANG H., SMITH C.E., HERMO L., SUAREZ S., ROTH B.L., DUCY P., KARSENTY G.: Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton. *Cell*, 2011, **144**, 796-809.
130. - OWENS A.P., MACKMAN N.: Tissue factor and thrombosis: The clot starts here [Internet]. *Thromb. Haemost.*, 2010, **104**, 432-439.
131. - ÖZCAN M.A., ÇÖMLEKÇİ A., DEMIRKAN F., YÜKSEL F., SARI İ., DEMİR T., ÖZSAN G.H., ÖRÜK G., YEŞİL S., ÜNDAR B.: Plasma levels of free tissue factor pathway inhibitor in patients with various thyroid disorders. *Thromb. Res.*, 2003, **110**, 243-247.
132. - PALTA S., SAROA R., PALTA A.: Overview of the coagulation system [Internet]. *Indian J. Anaesth.*, 2014, **58**, 515-523.
133. - PARKINSON A., MUDRA D.R., JOHNSON C., DWYER A., CARROLL K.M.: The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, **199**, 193-209.
134. - PAUL L.K., STAHMANN M.A.: Di-esters of 3,3'-methylenebis (4-hydroxycoumarin) and process of making them [Internet]. 1941,

135. - PISANO J.J., FINLAYSON J.S., PEYTON M.P.: [Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: epsilon-(gamma-glutamyl)lysine]. [Internet]. *Science*, 1968, **160**, 892-3.

136. - PITNEY W.R., DACIE J. V.: A Simple Method of Studying the Generation of Thrombin in Recalcified Plasma: Application in the Investigation of Haemophilia [Internet]. *J. Clin. Pathol.*, 1953, **6**, 9-14.

137. - PLUM P.: Relation between Prothrombin Concentration and Clotting Time¹ [Internet]. *Acta Med. Scand.*, 1943, **115**, 41-56.

138. - PRESCOTT C. V.: A Reappraisal of Blood Clotting Response Tests for Anticoagulant Resistance and a proposal for a standardised BCR Test Methodology. 21 pages, CropLife international, Brussel, 2003.

139. - PRICE P.A., URIST M.R., OTAWARA Y.: Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone [Internet]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, **117**, 765-771.

140. - PRICE P.A., WILLIAMSON M.K., HABA T., DELL R.B., JEE W.S.: Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, **79**, 7734-8.

141. - RAO L. V., RAPAPORT S.I.: Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988, **85**, 6687-6691.

142. - REBOUL E., BOREL P.: Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes [Internet]. *Prog. Lipid Res.*, 2011, **50**, 388-402.

143. - REUMANN S.: Biosynthesis of vitamin K1 (phylloquinone) by plant peroxisomes and its integration into signaling molecule synthesis pathways. *Subcell. Biochem.*, 2013, **69**, 213-229.

144. - REVERTER J.C., BÉGUIN S., KESSELS H., KUMAR R., HEMKER H.C., COLLER B.S.: Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and « clinical restenosis ». [Internet]. *J. Clin. Invest.*, 1996, **98**, 863-874.

145. - RIEDEL T., SUTTNAR J., BRYNDA E., HOUSKA M., MEDVED L., DYR J.E.: Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation [Internet]. *Blood*, 2011, **117**, 1700-1706.

146. - RISHAVY M.A., PUDOTA B.N., HALLGREN K.W., QIAN W., YAKUBENKO A. V., SONG J.-H., RUNGE K.W., BERKNER K.L.: A new model for vitamin K-dependent carboxylation: The catalytic base that deprotonates vitamin K hydroquinone is not Cys but an activated amine [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 13732-13737.

147. - ROBBIE L.A., DUMMER S., BOOTH N.A., ADEY G.D., BENNETT B.: Plasminogen activator inhibitor 2 and urokinase-type plasminogen activator in plasma and leucocytes in patients with severe sepsis [Internet]. *Br. J. Haematol.*, 2000, **109**, 342-348.

148. - ROLE T.H.E., FACTOR O.F., IN X.I., COAGULATION B.: Factor XI deficiency. 1996, **9**.

149. - ROZIN P., KALAT J.W.: Specific hungers and poison avoidance as adaptive specializations of learning. *Psychol. Rev.*, 1971, **78**, 459-486.

150. - RUBIOLO P., MATTEODO M., RICCIO G., BALLERO M., CHRISTEN P., FLEURY-SOUVERAIN S., VEUTHEY J.-L., BICCHI C.: Analytical Discrimination of Poisonous and Nonpoisonous Chemotypes of Giant Fennel (*Ferula communis* L.) through Their Biologically Active and Volatile Fractions [Internet]. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 7556-7563.

151. - RUGERI L., DELECROIX E., SCHERRER F., GROS A., LEVRAT A., FLOCCARD B., PERBET T., GRANJON S., DUMITRESCU O., ALLAOUCHICHE B., VINCIGUERRA C., NEGRIER C.: Thromboélastométrie rotative : réhabilitation de l'ancienne thromboélastographie. *Immuno-analyse Biol. Spécialisée*, 2006, **21**, 380-387.

152. - RUGSTAD H.E., HUNDAL O., HOLME I., HERLAND O.B., HUSBY G., GIERCKSKY K.E.: Piroxicam and naproxen plasma concentrations in patients with osteoarthritis: relation to age, sex, efficacy and adverse events. [Internet]. *Clin. Rheumatol.*, 1986, **5**, 389-98.

153. - RUSSELL J.C., HOLMES N.D.: Tropical island conservation: Rat eradication for species recovery [Internet]. *Biol. Conserv.*, 2015, **185**, 1-7.
154. - SABOL B.J., BASA R.R., WILKINS C.E.: Malabsorption-associated warfarin resistance [Internet]. *Am. J. Heal. Pharm.*, 2009, **66**, 1548-1553.
155. - SAGE M., FOUREL I., CŒURDASSIER M., BARRAT J., BERNY P., GIRAUDOUX P.: Determination of bromadiolone residues in fox faeces by LC/ESI-MS in relationship with toxicological data and clinical signs after repeated exposure. *Environ. Res.*, 2010, **110**, 664-674.
156. - SCHULMAN S., WANG B., LI W., RAPOPORT T.A.: Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 15027-15032.
157. - SEGERS K., DAHLBÄCK B., NICOLAES G.A.F.: Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms [Internet]. *Thromb. Haemost.*, 2007,
158. - SERVICE ÉVALUATION DES ACTES PROFESSIONNELS: BIOLOGIE DES ANOMALIES DE L'HÉMOSTASE TOME I: TEMPS DE SAIGNEMENT (ÉPREUVE DE DUKE ET TESTS D'IVY) [Internet]. 2011, **2**.
159. - SHAVLYUGIN E.A., HANIN L.G., KHANIN M.A.: Dynamics of pathologic clot formation: A mathematical model [Internet]. *J. Theor. Biol.*, 2014, **340**, 96-104.
160. - SHEARER M.J., FU X., BOOTH S.L.: Vitamin K Nutrition, Metabolism, and Requirements: Current Concepts and Future Research [Internet]. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.*, 2012, **3**, 182-195.
161. - SHLOSBERG A., EGYED M.N.: Experimental *Ferula communis* (giant fennel) toxicosis in sheep. [Internet]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. R. A*, 1985, **32**, 778-84.
162. - SILVERMAN R.B.: A model for a molecular mechanism of anticoagulant activity of 3-substituted 4-hydroxycoumarins. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 5421-5423.
163. - SILVERMAN R.B.: Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase [Internet]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 5939-5941.
164. - STAFFORD R.S., SINGER D.E.: Recent National Patterns of Warfarin Use in Atrial Fibrillation [Internet]. *Circulation*, 1998, **97**, 1231-1233.

165. - STANLEY T.B., HUMPHRIES J., HIGH K.A., STAFFORD D.W.: Amino Acids Responsible for Reduced Affinities of Vitamin K-Dependent Propeptides for the Carboxylase [Internet]. *Biochemistry*, 1999, **38**, 15681-15687.

166. - STENFLO J.: Dicumarol-induced prothrombin in bovine plasma. [Internet]. *Acta Chem. Scand.*, 1970, **24**, 3762-3.

167. - STENFLO J.: Vitamin K and the Biosynthesis of Prothrombin II. Structural comparison of normal and dicoumarol-induced bovine prothrombin. 1972, **247**, 8167-8176.

168. - STENFLO J.: Vitamin K and the Biosynthesis of Prothrombin III. Structural comparison of an NH₂-terminal fragment from normal and from abnormal dicoumarol-induced bovine prothrombin. *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**.

169. - STENFLO J.: Vitamin K and the Biosynthesis of Prothrombin IV. Isolation of peptides containing prosthetic groups from normal prothrombin and the corresponding peptides from dicoumarol-induced prothrombin. *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 5527-5535.

170. - STENFLO J.: Vitamin K and the Biosynthesis of Prothrombin from V. γ -carboxyglutamic acids, the vitamin K dependent structures in prothrombin. *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 5527-5535.

171. - STENFLO J., FERNLUND P., EGAN W., ROEPSTORFF P.: Vitamin K Dependent Modifications of Glutamic Acid Residues in Prothrombin [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1974, **71**, 2730-2733.

172. - STENFLO J., GANROT P.O.: Vitamin K and the Biosynthesis of Prothrombin I. Identification and purification of dicoumarol-induced abnormal prothrombin from bovine plasma. *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**.

173. - STENFLO J., GANROT P.O.: Binding of Ca²⁺ to normal and dicoumarol-induced prothrombin [Internet]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **50**, 98-104.

174. - STEPANIAN A., BIRON-ANDREANI C.: Exploration de l'hémostase primaire [Internet]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 2001, **59**, 725-35.

175. - STERLING C., THIERMANN A.: Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet. Pathol.*, 1981, **18**, 628-637.

176. - SUEHIRO Y., VELJKOVIC D.K., FULLER N., MOTOMURA Y., MASSÉ J.M., CRAMER E.M., HAYWARD C.P.M.: Endocytosis and storage of plasma factor V by human megakaryocytes [Internet]. *Thromb. Haemost.*, 2005, **94**, 585-592.

177. - TAGLIAPIETRA S., ARAGNO M., UGAZIO G., NANO G.M.: Experimental studies on the toxicity of some compounds isolated from *Ferula communis* in the rat. [Internet]. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1989, **66**, 333-6.

178. - TAKADA T., YAMANASHI Y., KONISHI K., YAMAMOTO T., TOYODA Y., MASUO Y., YAMAMOTO H., SUZUKI H.: NPC1L1 is a key regulator of intestinal vitamin K absorption and a modulator of warfarin therapy [Internet]. *Sci. Transl. Med.*, 2015, **7**, 275ra23.

179. - TALSTAD I.: Which coagulation factors interfere with the one-stage prothrombin time? [Internet]. *Haemostasis*, 1993, **23**, 19-25.

180. - THIJSEN H.H.W., VERVOORT L.M.T., SCHURGERS L.J., SHEARER M.J.: Menadione is a metabolite of oral vitamin K [Internet]. *Br. J. Nutr.*, 2006, **95**, 260-266.

181. - TLIGUI N., RUTH G.R.: *Ferula communis* variety *brevifolia* intoxication of sheep. [Internet]. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 1558-63.

182. - VANDENBROUCKE V., BOUSQUET-MELOU A., DE BACKER P., CROUBELS S.: Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration [Internet]. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 2008, **31**, 437-445.

183. - VÁRADI K., ROSING J., TANS G., SCHWARZ H.P.: Influence of factor V and factor Va on APC-induced cleavage of human factor VIII [Internet]. *Thromb. Haemost.*, 1995, **73**, 730-731.

184. - VERMEER C., JIE K.-S.G., KNAPEN M.H.J.: Role of Vitamin K in Bone Metabolism [Internet]. *Annu. Rev. Nutr.*, 1995, **15**, 1-21.

185. - VIEGAS C.S.B., CAVACO S., NEVES P.L., FERREIRA A., JOÃO A., WILLIAMSON M.K., PRICE P.A., CANCELA M.L., SIMES D.C.: Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. [Internet]. *Am. J. Pathol.*, 2009, **175**, 2288-98.

186. - VINETZ J.M., GLASS G.E., FLEXNER C.E., MUELLER P., KASLOW D.C.: Sporadic Urban Leptospirosis [Internet]. *Ann. Intern. Med.*, 1996, **125**, 794-798.

187. - VLOT A.J., KOPPELMAN S.J., BOUMA B.N., SIXMA J.J.: Factor VIII and von Willebrand Factor. *Thromb. Haemost.*, 1998, **79**, 456-465.

188. - WALLIN R., HUTSON S.M., CAIN D., SWEATT A., SANE D.C.: A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat [Internet]. *FASEB J.*, 2001,

189. - WANG D., CHEN H., MOMARY K.M., CAVALLARI L.H., JOHNSON J.A., SADÉE W., OLDENBURG J., BEVANS C., MULLER C., WATZKA M., BERKNER K., RUNGE K., ANSELL J., HIRSH J., POLLER L., BUSSEY H., JACOBSON A., HYLEK E., ROST S., FREGIN A., IVASKEVICIUS V., LI T., CHANG C., JIN D., LIN P., KHVOROVA A., STAFFORD D., SCONCE E., KHAN T., WYNNE H., YUAN H., CHEN J., LEE M., WADELIUS M., CHEN L., DOWNES K., BODIN L., VERSTUYFT C., TREGOUET D., D'ANDREA G., D'AMBROSIO R., PERNA P. Di, RIEDER M., REINER A., GAGE B., RETTIE A., TAI G., AQUILANTE C., LANGAEE T., LOPEZ L., INFORMATION N.C. for B., SCHWARZ U., RITCHIE M., BRADFORD Y., WEN M., LEE M., CHEN J., MONTES R., GAONA E.R. de, MARTINEZ-GONZALEZ M., ALBERCA I., HERMIDA J., SCHALEKAMP T., BRASSE B., ROIJERS J., THAM L., GOH B., NAFZIGER A., CALDWELL M., BERG R., ZHANG K., LARRAMENDY-GOZALO C., YANG J., VERSTUYFT C., MARSH S., KING C., PORCHE-SORBET R., SCOTT-HORTON T., EBY C., LEE S., NG S., OLDENBURG J., PROJECT I.H., CIRULLI E., GOLDSTEIN D., MOMARY K., SHAPIRO N., VIANA M., NUTESCU E., HELGASON C., CAVALLARI L., PINSONNEAULT J., NIELSEN C., SADEE W., WANG D., JOHNSON A., PAPP A., KROETZ D., SADEE W., et al: Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement. [Internet]. *Blood*, 2008, **112**, 1013-21.

190. - WESTHOFEN P., WATZKA M., MARINOVA M., HASS M., KIRFEL G., MÜLLER J., BEVANS C.G., MÜLLER C.R., OLDENBURG J.: Human Vitamin K 2,3-Epoxy Reductase Complex Subunit 1-like 1 (VKORC1L1) Mediates Vitamin K-dependent Intracellular Antioxidant Function [Internet]. *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 15085-15094.

191. - WHITLEY H.P., FERMO J.D., CHUMNEY E.C., BRZEZINSKI W.A.: Effect of patient-specific factors on weekly warfarin dose. [Internet]. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2007, **3**, 499-504.

192. - WIDHALM J.R., DUCLUZEAU A.-L., BULLER N.E., ELOWSKY C.G., OLSEN L.J., BASSET G.J.C.: Phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis in plants: two peroxisomal thioesterases of lactobacillales origin hydrolyze 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coa [Internet]. *Plant J.*, 2012, **71**, 205-215.

193. - YOON D.Y., MANSUKHANI N.A., STUBBS V.C., HELENOWSKI I.B., WOODRUFF T.K., KIBBE M.R.: Sex bias exists in basic science and translational surgical research [Internet]. *Surgery*, 2014, **156**, 508-516.

194. - ZHU X., SHIN W.G.: Gender differences in pharmacokinetics of oral warfarin in rats [Internet]. *Biopharm. Drug Dispos.*, 2005, **26**, 147-150.

VIII. ANNEXES

VIII.1 ANNEXE 1

LEFEBVRE S., GAULT G., LOUVET M-S., LATTARD V. et GRANCHER D., 2015. Ferulenol levels in french continental Giant fennel (*Ferula* sp.). In : XIXth Congress European society of Veterinary & Comparative Nutrition (ESVCN). Toulouse (France).

Ferulol and ferprenin levels of french continental giant fennel (*Ferula sp. L*)

LEFEBVRE Sébastien¹, GAULT Gilbert¹, LOUVET Marie-Sophie¹, LATTARD Virginie¹, GRANCHER Denis^{1*}

¹: USC 1233, Veterinary Campus of Lyon, F-69280 Marcy l'Etoile ; * : denis.grancher@vetagro-sup.fr



Giant fennel (*Ferula sp.L*) is a mediterranean plant (fig 1) responsible for deadly haemorrhagic intoxications in all mediterranean countries where it is growing. The intoxications occur in all animal species (horse, ruminants, pig, rabbit and rodents) (fig 2) and affect also humans (traditional self medication) (Gault *et al.*, 2013). They are due to the natural presence of ferulol, a prenylated 4-OH coumarin (fig 3). In France intoxications were only described in Corsica and the continental giant fennels were more or less considered as non poisonous. But there are a lot of botanical imprecisions in the determination of the different species of *Ferula* and there is a lack of data regarding the levels of ferulol in these plants. Moreover contradictory studies concern the toxicity of ferprenin. The aim of this preliminary study was to determine the different varieties growing in continental France and produce data about the presence and the levels of ferulol and ferprenin in order to estimate the risk for livestock.



Fig 1: *Ferula communis communis* L (Hyères – Var – France)

Material and methods

176 samples (one basal leaf per plant) were picked along the french mediterranean coast at the early spring (fig 4).

- botanical determination (Reduron, 2007; Cauwet-Marc, 1981)
- dry matter measurement: oven drying (60°C, 24 hours)
- samples treatment: grinding (particle size : 500 µm), storage in PP tubes away from natural light.
- samples extraction: acetonitrile (3 times), hexane (1 time to remove the lipids), evaporation, dilution with methanol, storage at -80°C.
- ferulol and ferprenin analysis: LC-MS-MS according to the method of Rubiolo *et al.* (2006) modified by Fourel *et al.* (2010). (Parent ion [MH]⁺=367; fragmented ion [MH]⁺=175 for ferulol A and B).
- statistics : student t-test (Microsoft® Excel 2008®/Mac)



Fig 2: Giant fennel intoxication (necropsic findings in sheep)

Results

Botanical determination (Table 1)

Genus	Species	Sub species	Varieties
Ferula	communis L	communis	communis
		<i>brevifolia</i>	
		<i>genuina</i> Burnat	
		catalaunica	catalaunica microcarpa Cauwet-Marc
	glauca L		

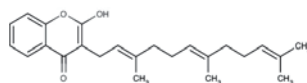


Fig 3: Chemical structure of ferulol

Table 1: Species and varieties of Giant fennel in continental France (bold letters in colored cells)

Dry matter, ferulol A and B and ferprenin (Table 2)

Giant fennels	N =	Dry matter	Ferulol A µg/g DM	Ferulol B µg/g DM	Ferprenin µg/g DM
<i>F. c. c. communis</i>	141	18.4 % (3.28) ^a	666.2 (1380.8) ^a	12.7 (13.5) ^a	220.7 (198.9) ^a
<i>F. c. cat. microcarpa</i>	14	22.8 % (2.61) ^b	95.1 (238.0) ^b	58.2 (28.3) ^b	70.1 (109.3) ^b
<i>F. glauca</i>	21	23.7 % (1.87) ^b	0.6 (1.3) ^c	53.2 (62.3) ^b	0.0 (0.0) ^c

Table 2: Dry matter and ferulol A, ferulol B and ferprenin levels of Giant fennel leaves in continental France (mean (SD), different superscript in the same column are significantly different, p<0.05)

Discussion-Conclusion

There are three species or varieties of giant fennel (*Ferula sp.L*) in continental France spread over three distinct areas.

The levels of ferulol A, ferulol B and ferprenin are different according to the different varieties.

The parallel between botanics and chemistry highlights the presence of chemotypes of *Ferula* with very different toxic potential.

The absence of clinical cases (compared to Corsica) may be due to:

- the different chemotypes of giant fennel (only *F.c.c. communis* in Corsica)
- the different systems of farming (usual free-ranging animals in Corsica).

References

- Cauwet-Marc AM 1981. Le complexe *Ferula communis* L dans ses populations du sud de la France et de la Corse. *Biologie Ecologie Méditerranéenne*, 8(3-4): 101-118.
- Fourel I *et al.* 2010. Validation of a New Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry Ion-Trap Technique for the Simultaneous Determination of Thirteen Anticoagulant Rodenticides, Drugs, or Natural Products. *J Anal Toxicol*, 34:95-102.
- Gault G *et al.* 2015. Giant fennel (*Ferula communis* L) intoxications in livestock in France. *Proc. 9th Congress ISOPP*. Hohhot (China) July 2013, (15) 1-5.
- Reduron JP 2007. Ombellifères de France. *Bulletin de la Société Botanique du centre ouest*, 3 (28): 1260-1300.
- Rubiolo P *et al.* 2006. Analytical discrimination of poisonous and non-poisonous chemotypes of giant fennel (*Ferula communis* L) through their biologically active and volatile fractions. *J Agric Food Chem*, 54(20): 7556-7563.



Fig 4: Locations of Giant fennel samplings

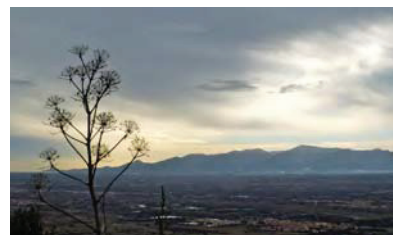


Fig 5: Giant fennel fruitiferous stem (Força Real – Pyrénées orientales – France)

VIII.2 ANNEXE 2

LEFEBVRE S., RANNOU B., BESSE S., DAMIN-PERNIK M., BENOIT E. et LATTARD V., 2016. Preliminary study on the efficiency of vitamin K on hypocoagulable rats. In : XXth Congress European society of Veterinary & Comparative Nutrition (ESVCN). Berlin (Allemagne.)

Introduction:

Vitamin K are essential molecules involved in the **post-translational activation** of some proteins called protein vitamin K dependent (PVKD). The best know PVKD are the four involved in the coagulation cascade: **factor II, VII, IX and X**. In mammals, vitamin K has two origins: foods and a recycling system led by an enzyme called Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1). The vitamin K requirement is dependent of the efficiency of this enzyme [1]. The aim of our work is to **block the recycling mechanism** in order to evaluate the **efficiency of vitamin K₁** to balance the recycle system and so to better understand the vitamin K₁ action.

Material and methods: Obtention of hypocoagulable rats then administration of vitamin K to regenerate their coagulability

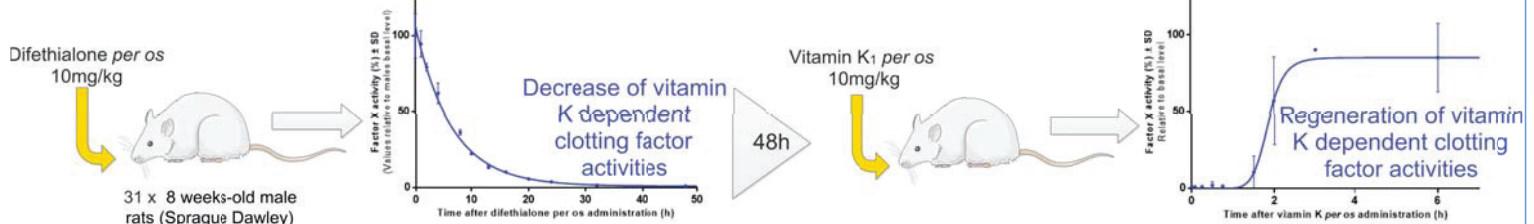


Figure 1: Experimental protocol used to explore the regeneration of vitamin K dependent clotting factors

Results:

The **delay between difethialone and vitamin K₁ administration** have been chosen to **maximize the diminution** of the vitamin K dependent **clotting factor activities** without involving death [2]. The results of the regeneration of vitamin K dependent clotting factor activities are presented on the figure 2. Regeneration evolutions fitted with a **sigmoidal model** (Factor II $R^2=0.88$; VII $R^2=0.84$; IX $R^2=0.78$; X $R^2=0.93$). After 360 minutes, **factor II** and **factor IX** were **significantly lower** ($P<0.05$) than their **basal activity** level before difethialone administration (set at 100%). For all factors, a lag time was observed during the first hour after the vitamin K administration. Then, **activities increased** during about **one hour** before to stagnate. The **prothrombin time** was within the **normal range from 120 minutes** (figure 3). The lag time was expected but not the different levels of factor activities. The difference between factors might be explained by different affinities in the post-transcriptional modification. The stop of increasing might be explained by lack of vitamin K. This arrest of regeneration was not described in the case of regeneration by recovery of recycling mechanism [3]. So, unrecycled vitamin K might have a different activity or affinity which leads to a new equilibrium.

● Factor II ■ Factor VII ▲ Factor IX ● Factor X

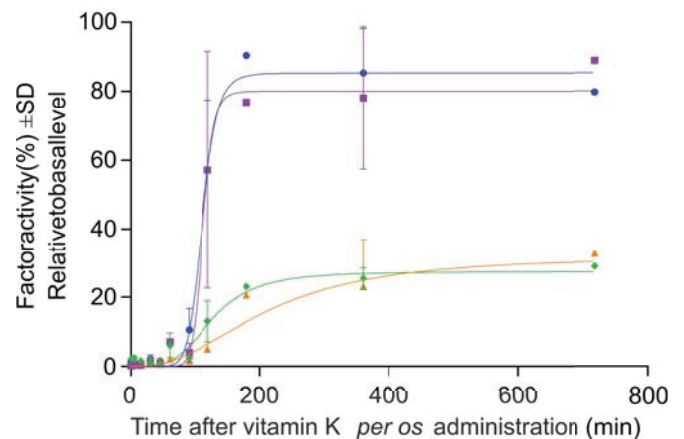


Figure 2: Evolution of factor II, VII, IX and X after administration of difethialone then, 48h after, administration of Vitamin K

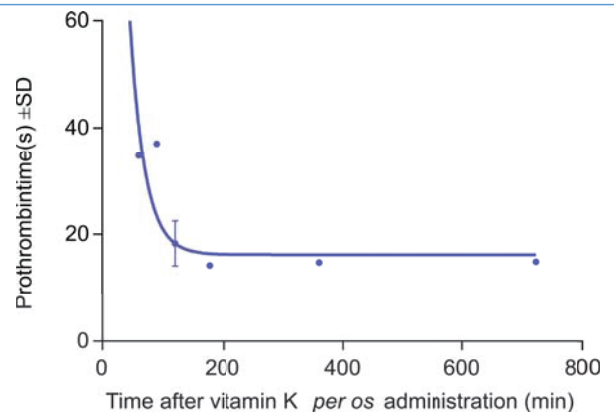


Figure 3: Evolution prothrombin time after administration of Difethialone then, 48h after, administration of Vitamin K

Conclusion:

Our experiment pinpoints that the regeneration of clotting factor activities is more **complex to understand than expected**. The study of the clotting factors' regeneration might disclose some new regulation mechanisms. By means of data provided by this study we are able to **design new experiments**, in order to **describe properly the regeneration mechanisms**.