



**HAL**  
open science

## Diversité des modes de résistance de cible aux antivitamines K chez les rongeurs

Joffrey Goulois

► **To cite this version:**

Joffrey Goulois. Diversité des modes de résistance de cible aux antivitamines K chez les rongeurs. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1048 . tel-01504208

**HAL Id: tel-01504208**

**<https://theses.hal.science/tel-01504208>**

Submitted on 9 Apr 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 : 2016LYSE048

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale « EDISS » ED 205  
(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé)**

**Spécialité de doctorat : BIOCHIMIE**

Soutenue publiquement 08/04/2016, par :  
**Joffrey GOULOIS**

---

# **DIVERSITÉ DES MODES DE RESISTANCE DE CIBLE AUX ANTIVITAMINES K CHEZ LES RONGEURS**

---

Devant le jury composé de :

Payen GAY, Léa	Maître de Conférences Toxicologie Université Lyon 1	Présidente
Gouat, Patrick	Maître de Conférences Université Paris 13, LEEC	Rapporteur
Petit, Claude	Professeur de Pharmacie-Toxicologie ENVT	Rapporteur
Michelin, Yves	Professeur Campus agronomique de Clermont	Rapporteur
Esther, Alexandra	Chercheur Julius Kühn-Institut	Examinatrice
Brouat, Carine	Chargée de Recherche CBGP Montpellier SupAgro	Examinatrice
Benoit, Étienne	Professeur Biochimie et Endocrinologie VetAgro-Sup	Directeur de thèse
Lattard, Virginie	Maître de Conférences Pharmacie VetAgro-Sup	Co-directrice de thèse
Caruel, Hervé	Responsable centre R&D Liphatech	Invité

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

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. le Professeur Y. MATILLON

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. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

# Remerciements

---

Le travail de synthèse que nécessite la rédaction d'une thèse n'est pas évident, mais cette page de remerciements est sans aucun doute celle qui aura nécessité le plus d'efforts et d'attention de ma part, tant je tiens à remercier comme il se doit toutes les personnes ayant contribué directement ou non à ce travail.

Mes premiers remerciements vont à chacun des membres de mon jury.

Je remercie très sincèrement M. Claude Petit, M. Patrick Gouat et M. Yves Michelin d'avoir accepté de rapporter cette thèse. Merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture de mon manuscrit ainsi qu'à l'élaboration de votre rapport, pour vos suggestions et vos remarques judicieuses.

Je remercie chaleureusement Mme. Alexandra Esther, Mme Carine Brouat et M. Hervé Caruel d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Je suis également très reconnaissant et honoré que Mme. Léa Payen Gay ait accepté de présider ma soutenance de thèse.

J'adresse également toute ma gratitude à Liphatech et à chacune des personnes travaillant au sein de cette entreprise. Je tiens particulièrement à remercier Hervé Caruel, Lionel Legros et Florian Peigneau. Hervé, je te remercie d'avoir été mon encadrant au sein de la société durant ces 3 années, et d'avoir toujours été disponible pour moi. Florian, merci pour ton aide précieuse avec les souris. Attraper une souris sauvage n'est vraiment pas évident, je défie quiconque de le faire avec autant d'aisance que toi. En revanche, je t'avoue que nos petits voyages à la benne d'équarrissage d'animaux ne vont pas me manquer ^^ . Lionel, j'ai vraiment pris grand plaisir à travailler avec toi. Tu m'as montré une vision du monde professionnel me permettant de faire la passerelle entre le monde du laboratoire et la réalité du terrain et du marché. De plus, je te suis vraiment reconnaissant pour les congrès que nous avons faits ensemble, toutes ces expériences ont largement contribué à me faire murir. Je te remercie sincèrement.

Je tiens à remercier spécialement mes deux encadrants de thèse, à savoir Etienne Benoit et Virginie Lattard. Sur le cadre scientifique, vos connaissances et votre capacité à jongler avec toutes vos responsabilités sont impressionnantes. Je vous suis vraiment reconnaissant d'avoir assuré un encadrement aussi rigoureux tout au long de ces années. Malgré vos nombreuses occupations vous avez toujours su vous rendre disponibles pour répondre à mes

interrogations, et pour suivre chacune des étapes de cette thèse. D'un point de vue humain maintenant, l'un comme l'autre, vous êtes justes exceptionnels. Je connais très peu de personnes qui prennent autant soin de leurs employés. Vous vous donnez à fond pour que le laboratoire tourne bien et pour que chaque personne s'y sente bien. Etienne, j'ai mis pas mal de temps pour quitter le vouvoiement... je te remercie : d'avoir passé autant de temps pour passer tous mes échantillons à la MS, de m'avoir permis de « squatter » ton bureau durant tout le temps de la rédaction, de tes précieux conseils et pour ta générosité constante. Virginie, tu m'as suivi durant ces 3 années, toujours présente pour quoique ce soit. Merci de m'avoir fait confiance pour cette thèse. Je garderais aussi de sacrés bons souvenirs de nos entraînements au jujitsu sur le tatami ^^.

Pour tout cela, vous avez ma profonde gratitude et mon respect.

Je tiens aussi à remercier Philippe Berny qui m'a permis d'entrer au sein de l'école vétérinaire en m'acceptant en stage de master 2. Tu m'as introduit dans la problématique des rongeurs sauvages qui m'a de suite intéressée et j'ai eu la possibilité de poursuivre en thèse.

Cette thèse a été le fruit du travail de plusieurs personnes, pas seulement le mien. J'ai eu la chance d'encadrer plusieurs stagiaires, qui de par leur travail, ont apporté plus qu'une pierre à l'édifice. Je dis bien une CHANCE, car c'est vraiment une partie de la thèse que j'ai le plus appréciée. C'est un exercice difficile d'encadrer un stagiaire, dans lequel j'étais novice, mais ce fut vraiment enrichissant. Ainsi, je remercie Joachim Mornet, Claire Hascoet, Audrey Chapuzet et Anne Sophie Pingon. Vous avoir encadré a été un plaisir.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Abdesslem Hamed et Benjamin Matagrin, qui ont pris le temps de me former sur chacune des manip, m'ont transmis leur expérience et leur rigueur scientifique. Vos conseils ont été précieux.

Un immense remerciement à tous les collègues : Marlene Damin-Pernik, Arnaud Michaux, Khedidja Dorani, Claire Hascoët, Ludivine Giraud, Sebastien Lefebvre, Maylis Boitet, Edwige Rousselière, Solange Couturier, Damien Guyomar. Nous avons su allier travail et plaisir, et vous êtes devenus bien plus que des collègues à mes yeux. Sans aucun doute, vous allez me manquer.

De nombreux stagiaires sont également passés au labo durant ces 3 années : BTS, IUT, Master, stagiaires véto, ils ont amené leur bonne humeur.

J'ai une pensée particulière pour une certaine demoiselle nommée Selena Farez, je te remercie d'avoir pris le temps de relire mon manuscrit, pour tes conseils judicieux, pour toutes les monstrueuses fautes d'orthographe corrigées. Marlene, merci aussi pour avoir participé à la relecture. Tu seras la prochaine à soutenir, mais avant cela, de merveilleux moments t'attendent, je penserai bien à toi.

Je ne peux terminer ces remerciements sans remercier mes amis, mes proches, pour leur soutien et simplement, leur amitié. Je suis pudique de nature, je ne sais pas vraiment faire des compliments et vous le savez bien, je préfère vous taquiner, mais je tiens beaucoup à vous. Vous d'Arras, de Lens, de Grenoble, de Lyon et du Brésil. Sur Lyon, durant ces 3 années j'ai eu la chance de rencontrer et de me lier avec plusieurs personnes qui se reconnaîtront. Je n'ai aucun regret, que de bons souvenirs.

Je nommerai tout de même mon amie d'enfance, Elise Couteux, ma paupiette d'amour. 26 ans que l'on se connaît, depuis la maternelle où nous avons su surmonter ton refus de m'épouser à cette époque, gros traumatisme ^^ jusqu'à aujourd'hui. Tu sais à quel point je tiens à toi, mais je tiens à l'écrire noir sur blanc.

Pour conclure ces remerciements, je termine par ce qui est le plus important à mes yeux : ma famille :

À mes parents qui m'ont toujours soutenu et été là pour moi. « Merci » ne me semble pas un mot suffisamment fort.

À ma sœur, Sandra, 5 ans d'écart, assez pour se chamailler quand nous étions plus jeunes, mais qu'est-ce que je suis content de t'avoir comme sœur. Je suis fier de notre relation, j'ai une chance incroyable de t'avoir.

À ma petite nièce et filleule : Lily, que j'adore plus que tout. Il n'y a pas une personne autour de moi qui n'ai pas vu sa photo, je saoule tout le monde à dire qu'elle est la plus mignonne des petites filles, mais en même temps j'ai carrément raison.

À mes grands-parents, mes cousins et mes cousines.

Ce ne sont pas des mots que je dis souvent, voire clairement jamais, ma pudeur m'en empêche mais je vous aime.

# Résumé

---

Les populations de rongeurs sont responsables de nombreux problèmes économiques et sanitaires. Pour ces raisons certains rongeurs sont qualifiés de nuisibles, tels que le rat brun, le rat noir et la souris domestique. En conséquence, leurs populations doivent être gérées. Cette gestion implique des mesures sanitaires et écologiques strictement indispensables mais passe aussi par l'utilisation de produits chimiques toxiques. Dans le cadre de la lutte chimique, les AVKs sont actuellement les molécules les plus utilisées. Ces AVKs inhibent la coagulation sanguine et sont à l'origine d'hémorragies mortelles. La cible pharmacologique des AVK est l'enzyme VKOR, codée par le gène *vkorc1*. Cependant, l'utilisation intensive des AVKs depuis les années 1950 a eu pour conséquence, chez les rongeurs, la sélection de résistance à ces molécules. La résistance de cible a été bien étudiée chez le rat brun mais est très peu connue chez la souris domestique et le rat noir.

Afin d'approfondir nos connaissances sur la résistance de cible de la souris une enquête de terrain impliquant de nombreux applicateurs répartis sur l'ensemble du territoire français, a été mise en place. Cette enquête a permis de mettre en évidence de nombreuses mutations dans le gène *vkorc1*. Nous avons observé la présence de mutations faux-sens uniques mais aussi la présence de doubles mutations impliquant la modification de deux acides aminés dans la protéine. Nous avons également retrouvés grâce à cette enquête des groupes de mutations qui avaient été décrites dans d'autres pays et qui sont issues de l'introgression du gène *vkorc1* de *Mus spretus* dans le génome de la souris domestique.

Nous avons cherché à caractériser les conséquences catalytiques des mutations faux-sens que nous avons observées dans le gène *vkorc1*. Dix-huit protéines mutées, présentant des mutations uniques mais aussi des doubles mutations, ont ainsi été produites par voie hétérologue. Leurs propriétés catalytiques et en particulier leurs sensibilités aux AVKs ont été caractérisées. Les mutations ne modifiant qu'un acide aminé induisent une faible résistance aux AVKs, à l'exception de deux mutations, Y139C et L128S. Ces deux mutations confèrent une résistance plus importante. Les doubles mutations engendrent une résistance sévère vis-à-vis des AVKs de première mais aussi de seconde génération.

Nous avons également cherché à étudier les conséquences, en terme de résistance, de l'introgression du gène *vkorc1 spretus* dans des souris domestiques. Ce gène présente 4 mutations par rapport à celui de la souris domestique. Néanmoins, dans la nature, de

nombreuses combinaisons issues de ces 4 mutations sont retrouvées. La mise en place d'une lignée porteuse de ces mutations a permis de préciser le phénotype résistant induit. L'expression hétérologue des protéines VKORC1 mutées porteuses de chacune de ces 4 mutations mais aussi des associations de ces mutations (doubles, triples et quadruples mutations) a été réalisée. Si aucune de ces mutations isolément n'induit une résistance notable, seules certaines associations de deux mutations mais surtout certaines associations de 3 mutations confèrent un profil de résistance très important comparable à celui de la *vkorc1 spretus*.

Nous nous sommes intéressés de façon très particulière à la mutation W59G que nous avons aussi retrouvée dans notre enquête. En effet, cette même mutation observée dans le gène humain inactive cette enzyme VKORC1. Nous avons piégé des souris porteuses de ce génotype, nous avons établi une lignée et nous avons étudié leur survie, leur résistance, leur activité VKOR hépatique et l'expression de *vkorc1*. La protéine recombinante VKORC1 de souris porteuse de la mutation W59G est inactive. Ces souris sont viables et se reproduisent même lorsque la mutation est à l'état homozygote. Elles sont résistantes au coumafène. Elles ne semblent pas exprimer le gène *vkorc1* alors même que le knock out naturel (syndrome VKCFD2) est mortel chez l'homme et le KO artificiel est mortel chez la souris. De façon surprenante, elles présentent une activité VKOR hépatique suggérant qu'un mécanisme de suppléance a dû être mis en place chez ces souris.

Chez le rat noir, nous avons observé une mutation de VKORC1 dans un élevage proche de Saragosse en Espagne dans lequel la gestion de ces rongeurs posait d'évidents problèmes. Nous avons caractérisé cette mutation Y25F et montré que cette mutation induisait une résistance, notamment à la bromadiolone. L'article publié correspond à la première démonstration d'une résistance de cible dans cette espèce.



# Table des Matières

---

<i>Remerciements</i> .....	3
<i>Résumé</i> .....	6
<i>Liste des Figures</i> .....	13
<i>Liste des Tableaux</i> .....	15
<i>Liste des Articles</i> .....	16
<i>Liste des Abréviations</i> .....	18
<i>Liste des Acides aminés</i> .....	20
<i>Partie 1 : Introduction générale</i> .....	21
<i>Partie 2 : Revue Bibliographique</i> .....	23
I. Les rongeurs .....	23
A. Les Rats .....	24
1. <i>Rattus rattus</i> .....	25
2. <i>Rattus norvegicus</i> .....	26
B. Les Souris .....	28
1. <i>Mus musculus domesticus</i> .....	28
2. <i>Mus Spretus</i> .....	30
C. Problèmes économiques .....	31
1. Impacts alimentaires .....	31
2. Impacts structuraux.....	32
3. Impacts écologiques .....	33
4. Impacts financiers.....	33
D. Problèmes sanitaires .....	34
1. Peste .....	35
2. Leptospirose .....	36
3. Hantavirus .....	40
E. Bénéfices des rongeurs .....	41
F. Gestion des populations de rongeurs .....	42
1. Dispositifs physiques .....	42
2. La lutte biologique.....	43
3. Lutte chimique.....	44

II.	La coagulation .....	49
A.	Hémostase Primaire .....	50
1.	Les acteurs majeurs de l'Hémostase Primaire .....	50
2.	La phase vasculaire.....	53
3.	La phase plaquettaire .....	53
B.	L'Hémostase secondaire.....	55
1.	Les facteurs de coagulation.....	55
2.	Déroulement du processus de coagulation.....	56
C.	L'Hémostase tertiaire ou Fibrinolyse.....	61
III.	La vitamine K .....	63
A.	Découverte .....	63
B.	Les différentes vitamines K.....	64
1.	La vitamine K1 .....	64
2.	La vitamine K2 .....	65
3.	La vitamine K3 .....	65
C.	Propriétés physico chimiques et Métabolisme .....	65
1.	Stabilité.....	65
2.	Absorption.....	66
3.	Transport de la vitamine K .....	67
4.	Stockage et métabolisation .....	67
5.	Excrétion.....	68
D.	Fonctions .....	68
1.	Direct .....	68
2.	Indirect .....	69
E.	Les PVKD .....	70
1.	GGCX.....	71
2.	Les différentes PVKD .....	73
IV.	Recyclage de la vitamine K .....	81
A.	Activité VKOR.....	82
1.	<i>Vkorc1</i> .....	82
2.	VKORC1L1.....	86
B.	Activité VKR .....	88
V.	Inhibition de l'activité VKOR.....	89
A.	Historique par AVKs et découverte de la warfarine .....	89
B.	Structure et propriété des AVKs.....	90
C.	Métabolisme chez le rat .....	92
1.	Généralités .....	92

2.	Exemple du métabolisme de la warfarine chez le rat .....	93
D.	Mécanisme d'action .....	94
E.	Ecotoxicité secondaire.....	96
VI.	Résistance aux AVKs chez les rongeurs .....	99
A.	Historique .....	99
B.	Résistance de Cible.....	100
1.	Historique .....	100
2.	Polymorphisme <i>vkorc1</i> .....	101
3.	Cytochrome P450 .....	106
C.	Coût biologique .....	107
	<i>Partie 3 : Objectifs de la thèse</i> .....	109
	<i>Partie 4 : Stratégie expérimentale</i> .....	111
	<i>Partie 5 : Matériels et méthodes</i> .....	112
I.	Matériels utilisés .....	112
A.	Réactifs de biologie cellulaire.....	112
B.	Réactifs biochimiques.....	112
C.	Réactifs de biologie moléculaire .....	112
D.	Matériel pour test <i>in vivo</i> .....	113
II.	Méthodes expérimentales .....	113
A.	Etude de la résistance en France.....	113
1.	Contact des professionnels .....	113
2.	Envoi des colis et réception.....	113
3.	Extraction de l'ADN génomique .....	113
4.	Amplification du gène <i>Vkorc1</i> par PCR.....	113
5.	Séquençage .....	114
6.	Lecture des séquences .....	115
7.	Résultats .....	115
8.	Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc .....	115
9.	PCR quantitative temps réel.....	115
B.	Etude « <i>in vitro</i> » .....	116
1.	Construction plasmidique .....	116
2.	Mutagenèse dirigée.....	117
3.	Transformation en bactérie.....	117
4.	Transformation en levures compétentes .....	117

5.	Expression des protéines recombinantes par culture de levure.....	118
6.	Récupération des fractions microsomales .....	119
7.	Dosage des résidus d'AVKs dans le foie .....	120
8.	Dosage des protéines microsomales.....	120
9.	Western Blot.....	121
10.	Activité enzymatique.....	121
11.	Analyse des résultats.....	122
C.	Expérimentation animale .....	123
1.	Animaux.....	123
2.	Création de la lignée W59G.....	123
3.	Tests réglementaires de suivi de mortalité .....	124
	<i>Partie 6 : Résultats</i> .....	125
I.	Caractérisation de l'implication des SNPs de <i>vkorc1</i> souris découverts lors du projet Ratail dans la résistance aux AVKs .....	125
A.	Objectifs.....	125
B.	Méthodes .....	125
C.	Principaux résultats .....	125
II.	Identification et caractérisation de la mutation Y25F découverte chez <i>Rattus rattus</i> .....	126
A.	Objectifs.....	126
B.	Méthodes .....	126
C.	Principaux résultats .....	126
III.	Etude des conséquences de l'introgession du gène <i>vkorc1</i> <i>spretus</i> dans des souris <i>Mus musculus domesticus</i> dans le phénotype de résistance aux AVKs .....	127
A.	Objectifs.....	127
B.	Méthodes .....	127
C.	Principaux résultats.....	128
1.	Etude <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de la résistance conférée par l'introgession de la <i>vkorc1</i> <i>spretus</i> .....	128
2.	Etude <i>in vitro</i> du rôle de chacune des 4 mutations ponctuelles impliquées dans la <i>vkorc1</i> <i>spretus</i> et étude de l'interaction de ces mutations ponctuelles dans le phénotype résistant de <i>VKORC1</i> <i>spretus</i> .....	129
IV.	Etude de la mutation W59G et de son implication dans le phénotype de résistance. ....	130
A.	Objectif : .....	130
B.	Méthode :.....	130
C.	Résultats : .....	130

<i>Partie 7 : Discussion</i> .....	132
<i>Partie 8 : Conclusions</i> .....	151
<i>Partie 9 : Perspectives</i> .....	153
<i>Partie 9 : Annexes</i> .....	156
<i>Partie 10: Bibliographie</i> .....	157

# Liste des Figures

---

Figure 1 : Photo de <i>Rattus rattus</i> .....	25
Figure 2 : Photo de <i>Rattus norvegicus</i> .....	26
Figure 3 : Photo de <i>Mus musculus domesticus</i> .....	28
Figure 4 : Photo de <i>Mus spretus</i> .....	30
Figure 5: Photographie au microscope électronique de <i>L. interrogans</i> , sérovar <i>icterohaemorrhagiae</i> par Levett <i>et al</i> (24) .....	38
Figure 6 : Schéma du mode d'opération de la Crimidine .....	45
Figure 7 : Shéma représentant l'équilibre hémostatique.....	49
Figure 8 : Les différentes étapes de la coagulation .....	50
Figure 9 : Structure de la paroi vasculaire .....	51
Figure 10 : Schéma d'une plaquette .....	52
Figure 11 : Étapes de la phase vasculaire .....	53
Figure 12 : Représentation de manière simplifiée de la cascade d'activations menant à la formation de fibrine .....	57
Figure 13 : Schéma du mécanisme de tranformation du fibrinogène en fibrine insoluble.....	59
Figure 14 : Schéma représentant la régulation de la coagulation par l'action de 3 mécanismes inhibiteurs .....	60
Figure 15 : Schéma de l'étape de fibrinolyse .....	61
Figure 16 : Noyau 2-méthyl-1,4 naphtoquinone .....	64
Figure 17 : Représentation des 3 types de vitamine K ( R comme chaine latérale) .....	64
Figure 18: Absorption intestinale et transport de la vitamine K jusqu'au foie par Shearer (52) ...	66
Figure 19 : Étape de gamma-carboxylation par GG CX.....	70
Figure 20 : Topologie de l'enzyme GG CX par stafford en 2005 (51).....	71
Figure 21 : Reaction de $\gamma$ -carboxylation selon Berkner (73).....	72
Figure 22 : Rôle de l'ostéocalcine non $\gamma$ -carboxylée selon Lee <i>et al</i> 2007.....	79
Figure 23 : Rétro-action positive de l'insuline sur la libération d'ostéocalcine non $\gamma$ -carboxylée selon Ferron <i>et al</i> en 2010.....	80
Figure 24 : Cycle du recyclage de la vitamine K (127).....	83
Figure 25 : Topologie de VKORC1 proposé par Li <i>et al</i> à gauche (129) et par Watzka <i>et al</i> à droite (130) .....	84

Figure 26 : Mécanisme réactionnel de la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone (Silverman, 1981) .....	85
Figure 27 : Mécanisme réactionnel de la réduction de vitamine K époxyde en vitamine K quinone (Matagrín <i>et al.</i> , 2013).....	86
Figure 28 : Topologie de VKORC1L1 d'après Westhofen <i>et al</i> (136) .....	87
Figure 29 : Structure chimique des trois familles d'AVKs .....	90
Figure 30 : Structure chimique des rodenticides les plus utilisés.....	91
Figure 31 : Métabolisme de la warfarine chez le rat catalysé par les CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11 et CYP3A2 (151) .....	94
Figure 32 : Représentation de Lineweaver et Burk d'une inhibition non-compétitive de l'activité VKOR par des microsomes de foies de rats sensibles (152).....	95
Figure 33 : Distribution géographique des mutations retrouvées chez le rat brun en Europe (164) .....	101
Figure 34 : Distribution géographique de la résistance chez <i>Rattus norvegicus</i> en France par Grandemange (175) .....	102
Figure 35 : Activité VKOR et inhibition par la warfarine des VKORC1 mutantes de rat ( Rost <i>et al</i> (174)) .....	103
Figure 36 : Facteur de résistance des rVKORC1 mutées exprimées en levure par rapport rVKORC1 sauvage.....	104
Figure 37 : Polymorphisme de vkorc1 chez la souris domestique en Europe (Song <i>et al</i> 2011) ..	105
Figure 38: Association entre le mécanisme de résistance de cible et la résistance métabolique par Ishizuka (151).....	107
Figure 39 : Formation de 3-OH-vitamine K par VKORC1 mutée en position 139 par Matagrín <i>et al</i> 2013.....	108
Figure 40 : Principe de la transformation des levures <i>Pichia pastoris</i> .....	118
Figure 41 : Expression des protéines recombinantes VKORC1 par la levure <i>Pichia pastoris</i> .....	119
Figure 42 : Carte représentant les modes de résistance aux AVKs développés par les souris en France .....	134
Figure 43 : Représentation de la structure de la protéine VKORC1 de souris avec localisation des différentes mutations rencontrées .....	138
Figure 44 : Localisation de souris possédant des doubles mutations en France.....	141

# Liste des Tableaux

---

Tableau 1: Facteurs intervenant dans les phénomènes thrombogènes et antithrombogènes. ....	49
Tableau 2 : Résumé des différents facteurs de coagulation.....	56
Tableau 3 : Doses de warfarine recommandées selon le variant CYP2C9 (Erickson <i>et al</i> (146)) ...	93
Tableau 4 : Données expérimentales établies chez le rat (38).....	97
Tableau 5 : Statut de la résistance dans le monde par Pelz en 2005 (162) .....	99
Tableau 6 : Mutations chez la souris retrouvées par Pelz <i>et al</i> (175).....	105
Tableau 7 : Comparaison entre les facteurs de résistance <i>in vitro</i> et la mortalité observée <i>in vivo</i> chez des souris introgressées <i>spretus</i> mâles et femelles pour des AVKs de première et seconde génération .....	145



# Liste des Articles

---

## Article accepté :

### Publication 1:

**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.**

Auteurs : Goulois J, Chapuzet A, Lambert V, Chatron N1, Tchertanov L, Legros L, Benoît E, Lattard V.

Revue : Pest Management Science.

Année : 2015

## Articles soumis :

### Publication 2:

**Study of the efficiency of anticoagulant rodenticides to control *Mus Musculus domesticus* introgressed with *Mus spretus* *Vkorc1***

Auteurs : Goulois J, Hascoët C, Besse S, Legros L, Benoit E, Lattard V.

Revue : Pest Management Science.

Année : 2015

### Publication 3:

**Adaptative evolution of the *vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides**

Auteurs : Goulois J, Lambert V, Legros L, Benoit E, Lattard V.

Revue : Molecular Ecology

Année : 2015

## **Articles en préparation :**

### **Publication 4:**

***In vitro* study of the role of each of the four point mutations involved in the *vkorc1* *spretus* and study of the interaction of these point mutations in the VKORC1 *spretus* resistant phenotype**

Auteurs : **Goulois J**, Chatron N, Benoit E, Lattard V.

### **Publication 5:**

**Study of mice mutated W59G *vkorc1*, an alternative pathway for vitamin K recycling?**

Auteurs : **Goulois J**, Benoit E, Lattard V.

## Liste des Abréviations

ADN :	Acide déoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
AVK :	Antivitamine K
BCR :	Blood-clotting response
BGP :	Bone Gla Protein (=ostéocalcine)
cM :	centiMorgan
CMLV :	Cellule musculaire lisse vasculaire
CYP :	Cytochrome P-450
(k)Da :	(kilo)Dalton
DTT :	Dithiothreitol
E. coli :	Escherichia coli
FR :	Facteur de résistance
Gas6 :	Growth arrest-specific gene 6
GGCX :	Gamma-glutamyl-carboxylase
Gla :	Acide aminé gamma-carboxyglutamate
Glu :	Acide aminé glutamique
INR :	International normalised ratio
insR :	Récepteur d'insuline
KCl :	Chlorure de potassium
Ki :	Constante d'inhibition
KM :	Constante de Michaelis-Menten
KO :	Knock out
LC/MS :	Liquid chromatography mass spectrometry
Mb :	Méga base
MGP :	Matrix gla protéin
MK :	Ménaquinone
NQO1 :	NAD(P)H déhydrogénase quinone 1
OC :	Ostéocalcine (=BGP)
P. pastoris :	Pichia pastoris
PCO :	Pest Control Operator
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PDI :	Protéine disulfure isomerase
PIVKA :	Protein induced by vitamin K antagonist
PS :	Protéine S
PVKD :	Protéine vitamine K-dépendante
PZ :	Protéine Z
Rpm :	Rotation par minute
RT-qPCR :	Reverse transcriptase and quantitative PCR
SNP :	Single nucleotide polymorphism
SVF :	Sérum de veau foetal
TM :	(segment) transmembranaire

TMG :	Proteines Gla transmembranaire
TQ :	Temps de Quick
Trx :	Thioredoxine
unOC :	Ostéocalcine non carboxylée
USC :	Unité sous contrat
Vitamine KH2 :	Vitamine K hydroquinone
Vitamine K>O :	Vitamine K époxyde
VKCFD2 :	Vitamin K Clotting Factor Deficiency 2
VKOR (activité) :	(activité) vitamine K époxyde réductase
VKORC1 :	Vitamine K époxyde réductase sous-unité 1
VKORC1L1 :	VKORC1-like 1
VKR (activité) :	(activité) vitamine K quinone réductase
Vmax :	Vitesse maximale

## Liste des Acides aminés

---

	Abréviation	Code	Chaîne latérale	Nature
Alanine	Ala	A	0	Apolaire, Aliphatique
Arginine	Arg	R	-C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub>	Basique
Asparagine	Asn	N	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ON	Polaire
Aspartate	Asp	D	-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Acide
Cystéine	Cys	C	-CH <sub>3</sub> S	Polaire
Glutamate	Glu	E	-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	Acide
Glutamine	Gln	Q	-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> ON	Polaire
Glycine	Gly	G	-H	Apolaire, Aliphatique
Histidine	His	H	-C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	Basique, Aromatique
Isoleucine	Ile	I	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Apolaire, Aliphatique
Leucine	Leu	L	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Apolaire, Aliphatique
Lysine	Lys	K	-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N	Basique
Méthionine	Met	M	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> S	Apolaire
Phénylalanine	Phe	F	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Apolaire, Aromatique
Proline	Pro	P	-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	Apolaire
Sérine	Ser	S	-CH <sub>3</sub> O	Polaire
Thréonine	Thr	T	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O	Polaire
Tryptophane	Trp	W	-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N	Apolaire, Aromatique
Tyrosine	Tyr	Y	-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O	Polaire, Aromatique
Valine	Val	V	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Apolaire, Aliphatique

# *Partie 1 : Introduction générale*

---

Les rongeurs sont des animaux capables de dévaster des cultures et de détruire des stocks entiers de denrées alimentaires par consommation directe ou dégradation due à des excréta. Chaque année, les pertes céréalières totales estimées seraient de l'ordre de 10% à 20% de la production mondiale. Les pertes estimées de riz seulement, sous l'action des rongeurs, correspondent à la consommation humaine de 230 millions de personnes. En pensant que la famine est encore présente dans certaines parties du monde, ce constat est effarant. De plus, de par leur activité de grugeage, les rongeurs sont à l'origine de nombreux dégâts infrastructureux, et d'incendies. Ils sont donc responsables de problèmes économiques majeurs, mais également de problèmes sanitaires sérieux. En effet, ils sont réservoirs de plus de 40 pathogènes tels que la leptospirose, la peste ou encore les hantavirus, responsables de la mort de plusieurs milliers de personnes chaque année. Ces rongeurs sont donc qualifiés de nuisibles et une gestion de leur population est donc indispensable.

Cependant, de par leur vitesse de reproduction fulgurante, leur comportement néophobe et d'éviction alimentaire, cette lutte est particulièrement compliquée. Différentes molécules sont commercialisées en France, cependant les antivitamines K (AVKs) sont les produits les plus fréquemment utilisés car ils contournent le comportement d'éviction alimentaire des rongeurs. En effet, ces AVKs tuent les rongeurs dans un délai de 3 à 4 jours ce qui empêche les autres membres de la colonie de rongeurs de faire le lien entre l'AVK ingéré et la mort de leurs congénères.

Les AVKs sont des molécules destinées à empêcher ou à retarder la coagulation du sang. Ils augmentent la fluidité sanguine et sont donc susceptibles de provoquer des saignements. Pour ce faire, ces AVKs vont interagir avec une enzyme clé du recyclage de la vitamine K : la VKORC1. Or cette vitamine K est essentielle pour la coagulation. En inhibant VKORC1, les AVKs empêchent le recyclage de la vitamine K et engendrent une augmentation de la fluidité sanguine. Ces molécules ont été utilisées, au départ, pour le traitement de maladies thromboemboliques chez l'Homme. Puis ces AVKs ont été utilisés comme rodenticides afin de gérer les populations de rongeurs.

La large utilisation des AVKs comme rodenticides a débuté après la seconde guerre mondiale, avec pour commencer l'utilisation d'AVKs de première génération. Cependant, des phénomènes de résistance sont apparus, d'abord chez le rat brun, suivi ensuite de très près chez la souris, rendant ces molécules de première génération peu efficaces. L'inefficacité de

ces molécules a conduit les industriels à développer des AVKs de plus en plus efficaces appelés AVKs de seconde génération. Ces AVKs de seconde génération ont cependant des inconvénients majeurs de par leur nature très hydrophobe, ils ont une demi-vie plus longue, sont plus rémanents et entraînent des intoxications secondaires. Ainsi, de nombreux rapaces ou encore des renards ont été intoxiqués en se nourrissant des carcasses de rongeurs ayant consommé des AVKs. Une utilisation raisonnée des AVKs soit de première génération, soit de seconde génération est nécessaire afin d'exercer une gestion efficace des populations de rongeurs tout en diminuant le plus possible le risque d'écotoxicité secondaire.

Cette gestion efficace passe par une meilleure compréhension du phénomène de résistance. Une partie de cette résistance peut être métabolique, avec une métabolisation plus rapide des AVKs due à l'expression des cytochromes P-450, tel que l'enzyme codée par le gène CYP2C9. Mais cette résistance provient essentiellement de mutations sur le gène *vkorc1* codant pour l'enzyme VKORC1 cible des AVKs. Cette résistance est appelée résistance de Cible. Elle est telle que des populations de rats bruns ou de souris peuvent survivre à des doses 200 fois plus élevées que la dose normalement létale.

La résistance aux AVKs a été particulièrement bien étudiée chez *Rattus norvegicus*. En revanche, la résistance chez *Mus musculus domesticus* ainsi que chez *Rattus rattus* est nettement moins connue, cependant de plus en plus de problèmes de gestion de ces rongeurs sont relatés.

Face à l'utilisation intensive des AVKs, il est indispensable de mieux connaître la résistance aux AVKs autant dans un intérêt économique et écologique que dans un intérêt sanitaire. L'objectif de cet ouvrage est une meilleure compréhension de la résistance de cible chez la souris et le rat noir en France. Afin de répondre à cet objectif, l'étude Ratail a été mise en place, consistant en une collecte d'échantillons de souris venant de toute la France et en une analyse de la séquence de leur gène *vkorc1*. Nous nous sommes ensuite focalisés sur la caractérisation biochimique des mutations du gène *vkorc1* détectées au cours de cette étude en France.

Afin de développer ce travail que j'ai réalisé, je consacrerai la première partie de ce mémoire à une revue bibliographique des connaissances actuelles qui ont orienté mes travaux. Dans une seconde partie, ces travaux seront décrits et seront par la suite suivis dans une troisième partie, d'une discussion générale.

## ***Partie 2 : Revue Bibliographique***

---

### **I. Les rongeurs**

L'urbanisation de la population mondiale est en constante augmentation depuis le début des années 80. Avant cette période, la population était principalement rurale. Avec l'essor de l'industrialisation, les populations ont quitté les campagnes pour venir s'établir en ville. Dans les années 1800, on considérait que 2% de la population mondiale vivait en ville. Cette proportion a graduellement augmenté, en passant de 14% en 1900 puis à 30% (1). Actuellement, on considère que près de 50% de la population mondiale se trouve en milieu urbain.

Cette urbanisation grandissante a eu inexorablement des conséquences écologiques en modifiant les milieux. Les paysages agricoles ont été remplacés par des milieux urbains et suburbains. Ce changement a détruit de nombreux habitats propices à accueillir différentes espèces fauniques, mais il a aussi favorisé la création de nouvelles niches écologiques dans les espaces urbains. Ces niches représentent une opportunité intéressante pour les rongeurs. Le mode de vie urbain a également évolué au fil des décennies, ainsi les greniers abritent maintenant de moins en moins de nourriture de type céréales ou graines. Par contre, les égouts se généralisent et les déchets de l'alimentation humaine, qui comprennent de plus en plus de viande, attirent les rongeurs en ville. Parmi ces rongeurs, on retrouve principalement, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* et *Mus musculus domesticus*. Ces espèces ont donc proliféré en milieu urbain. De ce fait, de nombreuses études ont été menées sur ces rongeurs, en commençant par leurs origines et leur mode de vie.

Il est important de noter que certains de ces rongeurs, tel que *Rattus norvegicus*, possèdent un système complexe de hiérarchie entre les membres d'une même colonie. Les ressources trophiques, qui correspondent à l'ensemble des possibilités d'alimentation et de nidification disponibles en un endroit, conditionnent la régulation des colonies murines. Un phénomène d'autorégulation est mis en place naturellement. Ce phénomène s'explique grâce à plusieurs comportements. Dans une colonie murine, les femelles matures inhibent les capacités de reproduction des jeunes femelles, le temps de trouver un nouveau territoire. De plus, si les ressources alimentaires sont réduites, les femelles peuvent naturellement repousser les mâles afin d'espacer la fréquence des portées, et dans certains cas elles peuvent même également



tuer leur progéniture. Enfin, les jeunes mâles reproducteurs sont souvent chassés de la colonie, ce qui est à l'origine de la migration de ces individus vers de nouveaux territoires pour former une nouvelle colonie. Ce comportement explique la dissémination rapide des rongeurs.

Le mode de vie de ces rongeurs sera développé dans la suite de cette partie, ainsi que les problèmes économiques et sanitaires engendrés par ces animaux. Enfin, nous terminerons par les moyens de lutte existant actuellement, afin de gérer ces populations de rongeurs.

## **A. Les Rats**

Taxonomie : *Animalia, Eumetazoa, Bilateria, Deuterostomia, Chordata, Craniata, Vertebrata, Gnathostomata, Euteleostomi, Sarcopterygii, Tetrapoda, Amniota, Synapsida, Mammalia, Theria, Eutheria, Rodentia, Myomorpha, Muroidea, Muridae, Murinae, Rattus*

Les rats peuvent être présents dans tous les endroits tempérés de la planète. Ceux qui sont commensaux ont proliféré en même temps que les humains. *Rattus rattus* et *Rattus norvegicus* sont les espèces de rats commensales. Cependant, il n'y a jamais eu de compétition entre ces deux espèces car ils ne fréquentent pas les mêmes biotopes et ont donc rarement l'occasion de se faire face et de s'affronter. D'ailleurs de nombreux témoignages de dératisseurs expérimentés établissent l'existence de doubles infestations pacifiques avec *Rattus norvegicus* vivant dans les caves et les étables et *Rattus rattus* vivant en hauteur notamment dans des silos à grains.

## 1. Rattus rattus



Figure 1 : Photo de *Rattus rattus*

Provenant des forêts équatoriales d'Asie du sud-est (2), *Rattus rattus* est également prénommé rat noir dû à son pelage sombre (figure 1). Son histoire n'est pas très bien connue, cependant, on estime qu'il était présent en Europe dès le début de l'Empire romain, soit au IV<sup>e</sup> siècle (3), et prospère grâce au transport commercial terrestre et maritime. Il est très commun au Moyen Age et jusqu'à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle (2). Le rat noir a été par la suite supplanté par *Rattus norvegicus*.

*Rattus rattus* trouve dans les villes de l'époque un biotope convenant à sa nature frileuse et arboricole : un abri chaud et élevé avec des provisions en grains et en fruits.

Morphologiquement, le rat noir possède un museau pointu de forme triangulaire, de gros yeux et de grandes oreilles arrondies, minces, mobiles, translucides, et dépourvues de poils. Sa queue est longue et effilée, gris foncé, avec 260 anneaux, et est surtout plus grande que son corps (une longueur d'environ 25 cm pour un corps compris entre 17 et 20 cm (2)). Il possède 4 doigts aux pattes antérieures et 5 aux postérieures. Son pelage varie du noir à l'agouti avec souvent sa partie ventrale plus claire. Son poids maximal est aux alentours de 250 g, ce qui le place, au niveau de son gabarit, bien en dessous du rat brun.

Sa maturité sexuelle est atteinte vers 68 jours, avec une durée de gestation moyenne de 21 jours (3). Les femelles ont en moyenne 3 à 5 portées par an. Les portées se composent généralement de 5 à 8 petits. Les petits sont sevrés vers 3 à 4 semaines.

Le rat noir possède une mauvaise vision des couleurs, en revanche ses sens de l'odorat, de l'ouïe et du toucher, grâce aux vibrisses, sont vraiment très développés.

Leur longévité, dans la nature, ne dépasse généralement pas un an, en revanche, en captivité, les individus peuvent vivre plusieurs années. Un projet de domestication a d'ailleurs été tenté dans les années 80/90 en Angleterre. Cela n'a pas engendré un grand succès, dû à leur nature sauvage, ils sont beaucoup plus compliqués à domestiquer que le rat brun.

Ce sont des animaux sociaux qui vivent en petits groupes familiaux hiérarchisés (3), pouvant atteindre plus d'une cinquantaine d'individus. Ils préfèrent nicher dans les parties supérieures des structures. En effet, ce sont de bon grimpeurs, mais ils peuvent aussi sauter en longueur et en hauteur jusqu'à 1,20 m. Ces animaux préfèrent les lieux chauds et secs car ils sont très sensibles à l'humidité. Ils sont omnivores à tendance frugivore et granivore, la quantité de nourriture absorbée est importante car ils consomment entre 10% et 15% de leur poids par jour (3).

## 2. *Rattus norvegicus*



Figure 2 : Photo de *Rattus norvegicus*

*Rattus norvegicus* est également nommé : rat brun, rat surmulot ou encore rat d'égout (figure 2). Son nom laisserait présager qu'il vient de Norvège, mais en réalité il n'en est rien. Il provient d'Asie, plus précisément de Chine et du Japon. Il arrive en Europe au cours du XVIII<sup>ème</sup> siècle, en empruntant comme le rat noir les moyens de transport commerciaux, et supplantant petit à petit le rat noir.

Morphologiquement, *Rattus norvegicus* possède un museau court et assez carré, avec de petits yeux. Ses oreilles sont courtes et épaisses, velues, aux poils ras et fins. Sa queue est épaisse, annelée et dépourvue de poils, elle apparaît grise-bicolore. Il possède un corps d'une longueur de 25 cm environ, avec une queue d'une taille équivalente à son corps. Adulte, il peut peser de 350 à 500g. Il est donc plus gros et plus lourd que le rat noir. Il possède 4 doigts aux pattes antérieures et 5 aux postérieures. Son pelage est court, d'apparence hirsute, qui varie du roux au gris brun mais avec une partie ventrale gris claire.

Sa maturité sexuelle est atteinte très tôt vers 50 jours (3). La durée de gestation est comprise entre 22 et 24 jours. Les femelles, dans la nature, peuvent avoir entre 3 et 5 portées par an avec 7 à 8 petits par portée. La mère allaite ses petits durant 3 semaines et s'en occupe jusqu'à la portée suivante. Ainsi, le rat brun est une espèce possédant un très fort taux de renouvellement de sa population.

Les petits, à la naissance, sont aveugles et dépourvus de poils. Ils ouvrent les yeux au bout de 15 jours et le nid est abandonné au bout de 22 jours. Le rat brun, comme *Rattus rattus*, ne possède pas une bonne vue, il se fie plutôt à son odorat et à son ouïe pour interagir avec son environnement, et utilise aussi énormément ses vibrisses. Il possède une bonne aptitude à la course et à la nage, mais il n'est pas aussi bon grimpeur que le rat noir. Il peut tout de même sauter jusqu'à 60 cm de hauteur et passer à travers des trous de 12 mm de diamètre.

*Rattus norvegicus* est un animal qui aime l'humidité et vit à proximité d'un point d'eau car ses besoins en eau sont très importants. Il vit généralement à l'extérieur, ne s'introduisant dans les entrepôts que pour y trouver une source alimentaire. Il réside dans des terriers creusés à proximité de bâtiments ou sous des fondations. Il vit en colonie, en petites unités familiales organisées et défendant féroceMENT leur territoire qui peut s'étendre sur une surface de 100 m<sup>2</sup> environ. C'est un rongeur avec un comportement plutôt agressif. Il est omnivore et adapte son régime alimentaire en fonction du milieu dans lequel il se trouve. Le rat brun consomme jusqu'à 1/10ème de son poids par jour, soit environ 25 g de nourriture (3).

## B. Les Souris

Taxonomie : *Animalia*, *Eumetazoa*, *Bilateria*, *Deuterostomia*, *Chordata*, *Craniata*, *Vertebrata*, *Gnathostomata*, *Euteleostomi*, *Sarcopterygii*, *Tetrapoda*, *Amniota*, *Synapsida*, *Mammalia*, *Theria*, *Eutheria*, *Rodentia*, *Myomorpha*, *Muroidea*, *Muridae*, *Murinae*, *Mus*.

La souris a probablement une répartition mondiale, plus étendue que n'importe quel autre mammifère hormis l'Homme. Leur répartition géographique a d'ailleurs été facilitée par sa relation commensale de certaines espèces (*Mus musculus domesticus*) avec les humains, qui remonte au moins à 8000 ans. Le genre *Mus* regroupe 4 espèces en Europe. Nous nous intéresserons pour la suite exclusivement à deux espèces de souris : *Mus musculus domesticus* et *Mus spretus*.

### 1. *Mus musculus domesticus*



Figure 3 : Photo de *Mus musculus domesticus*

L'aire d'origine de l'ancêtre commun du complexe d'espèce *Mus musculus* est le sous continent indien. Les migrations et les fondations de colonies ont permis leur extension sur les différents continents (3). *Mus musculus domesticus* aurait migré soit par l'Afrique du nord soit par la Turquie. Cette espèce de taille relativement petite, mesure chez l'adulte entre 7 et 18 cm, et pèse généralement entre 14 et 30 g (figure 3). Sa queue est plus longue que son corps (2), et est munie de rares poils très fins. Ses membres antérieurs possèdent 4 doigts munis de griffes et d'un pouce atrophié, tandis que ses membres postérieurs sont plus longs et

dotés de 5 orteils munis également de griffes. Sa coloration varie très largement, en fonction de la région et du biotope qu'elle habite. En général, son pelage est gris-brun, assez uniforme, et la face ventrale est légèrement plus claire. Les femelles sont matures entre le 28<sup>ème</sup> et le 49<sup>ème</sup> jour. La gestation dure entre 18 et 24 jours. Elles peuvent avoir 4 à 6 portées par an, allant de 5 à 7 petits. Cela a pour conséquence une prolifération très rapide de l'espèce en un laps de temps très court.

Cette espèce est très bonne grimpeuse et peut sauter jusqu'à 30 cm de hauteur. Sa petite taille lui permet de passer dans des ouvertures de 6 mm de diamètre, donc pratiquement partout.

C'est une espèce qui se montre peu, elle est généralement active au crépuscule et surtout la nuit.

Les souris possèdent une excellente audition et un sens de l'odorat très développé. Elles peuvent communiquer entre elles grâce à des cris aigus. De plus, de nombreuses études attestent d'une communication chimique. En effet, le sens olfactif est utilisé principalement dans les échanges sociaux, comme le marquage de territoire, la recherche de partenaires sexuels, ou encore l'identification des congénères (4). Des récepteurs olfactifs nommés V2 localisés dans la muqueuse de l'organe vomero-nasal sont à l'origine de ce phénomène (5). Ils sont exprimés conjointement avec les récepteurs du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Ils semblent intervenir dans la reconnaissance de l'identité du partenaire sexuel. Ainsi cela permettrait notamment de limiter l'accouplement entre individus consanguins et favoriserait la diversité génétique.

La vie sociale des souris est fortement régulée par la détection qu'elles opèrent, grâce aux odeurs, entre individus de divers statuts, dominants ou dominés, reproducteurs ou non. Jane Hurst, de l'université de Liverpool, a montré que via l'urine, de nombreuses informations sont émises telles que l'état physiologique des femelles, ou encore le statut social de la souris. Les composés volatils responsables ont été localisés dans l'urine ou la glande prépucciale des mâles. Ces odeurs peuvent directement affecter l'état physiologique des femelles (6) en déclenchant la puberté, en synchronisant les cycles œstraux : l'effet Whitten, et peuvent même parfois causer l'avortement des femelles gestantes : l'effet Bruce.

Les souris domestiques sont des animaux très curieux, qui errent sans cesse d'un endroit à un autre en grignotant ça et là. De grands déplacements de ces individus entre des fermes sur des distances supérieures à 500 m voire jusqu'à 2 km ont d'ailleurs été observés (3). Elles ont un régime omnivore. Elles occupent toutes les formes d'habitat humain, des immeubles en agglomération aux bâtiments agricoles, des entrepôts et même des refuges en haute altitude.



## 2. Mus Spretus



Figure 4 : Photo de *Mus spretus* (source : <https://www.flickr.com>)

*Mus spretus* a été décrite en 1863 par Lataste en Algérie (figure 4). Elle se serait différenciée en Afrique du nord puis elle aurait migré vers l'Europe du sud-ouest. De ce fait, ces souris sont présentes dans 4 pays du Maghreb : au Maroc, en Algérie, en Libye et en Tunisie. Elles sont ensuite remontées dans la quasi-totalité de l'Espagne ainsi qu'au Portugal et dans le sud de la France. Du fait de ses faibles besoins en eau, *Mus spretus* peut occuper des biotopes plus arides que *Mus musculus domesticus*. *Mus spretus* vit toujours à l'état sauvage et n'est jamais commensale comme la souris domestique (3).

Morphologiquement, *Mus spretus* diffère peu de *Mus musculus domesticus*, mis à part la queue de *Mus spretus* qui est plus fine, plus claire et plus courte. En effet, la queue est moitié plus petite que le corps. De plus, la *Mus spretus* ne dégage pas la même odeur musquée caractéristique de *Mus musculus domesticus*.

Les femelles sont matures à 6 ou 7 semaines et les mâles un peu plus tard vers 8 semaines. Elles peuvent avoir des portées de 5 petits environ (3).

Ces deux espèces sont sympatriques sur une partie de leurs aires de répartition géographique, de ce fait une hybridation entre ces 2 espèces est possible (7). Mais cette hybridation n'est possible que dans un seul sens. Les mâles *spretus* peuvent s'accoupler avec une femelle *Mus*

*musculus domesticus* et engendrer des hybrides fertiles. L'inverse, en revanche, conduit à la formation d'embryons qui meurent au 18<sup>ème</sup> jour de leur développement in utero.

L'hybridation de ces 2 espèces permet le transfert d'une partie du génome de *Mus spretus* dans le celui de *Mus musculus domesticus*. Les conséquences de ce transfert constituent une partie importante du travail dans cette thèse. Ces souris introgressées ont été retrouvées en Espagne, en Allemagne ainsi que dans le sud de la France (7).

## **C. Problèmes économiques**

Les rongeurs cités précédemment sont généralement qualifiés d'individus commensaux. Une relation de commensalisme implique qu'une espèce tire profit d'une autre espèce sans lui causer de préjudice. Hors, ce n'est pas le cas pour la relation unissant les rongeurs à l'homme. Le terme kleptoparasitisme serait plus approprié pour caractériser l'association existant entre rongeurs et humains (4). Cette relation se produit au détriment de l'Homme, puisqu'elle entraîne des impacts négatifs importants tant au niveau social qu'économique. Les coûts associés à la présence de rongeurs sont difficiles à estimer. Ils sont la somme de plusieurs facteurs : des impacts alimentaires, infrastructureux et industriels, environnementaux et écologiques.

### **1. Impacts alimentaires**

D'importantes pertes économiques sont reliées à la consommation et à la contamination de la nourriture (3). Les rongeurs peuvent causer des dégâts directs sur les récoltes en dégradant les pieds des cultures ou en dégradant les lieux de stockages céréaliers. Ces derniers étant des réserves de nourriture abondante, ils sont un milieu idéal pour le développement d'une colonie de rongeurs.

En considérant une production mondiale de graines, comprenant les céréales, les légumineuses et les oléagineuses (d'après le site [www.statistica.com](http://www.statistica.com)), en 2015 d'environ 2,5 milliards de tonnes, 20% de cette production est rendue inutilisable après le stockage à cause majoritairement de la consommation et des souillures engendrées par les rongeurs. Ces pertes au stockage représentent 500 millions de tonnes de graines, soit la quantité nécessaire pour nourrir 1,35 milliard d'hommes. Les pertes avant même le stockage ne sont pas prises en compte dans ces chiffres. Cependant, de nombreux rongeurs dégradent les cultures avant



même la récolte en s'attaquant aux pieds des plantes cultivées, tels que *Microtus arvalis* ou *Arvicola terrestris*.

## 2. Impacts structureaux

De nombreux dommages sont engendrés par l'activité de grugeage et de creusage. Les rongeurs, possédant des incisives à croissance continue, consomment toutes sortes de nourriture, mais également toute sortes de matériaux, des meubles en bois à des appareils électroniques en passant par des fils électriques. On estime que les rongeurs passent 2% de leur temps à gruger, ainsi ils sont responsables d'importantes dégradations pouvant amener à des situations potentiellement dangereuses. De nombreux exemples peuvent étayer ces propos.

En quelques années, en grugeant la structure de supports d'immeuble, les rats sont capables de détruire ou d'infliger des dégâts considérables à un immeuble (8). De plus, de part leur activité de creusage, en créant des galeries, ils peuvent provoquer des glissements de terrains, l'affaissement de digues et de canaux entraînant des inondations (8).

Les rongeurs sont également responsables de nombreux incendies en rongant les câbles électriques. Les compagnies d'assurance américaine estiment qu'environ 25% des feux dont la cause est inconnue sont dus aux rongeurs (9). Egalement, en grignotant les fils électriques, les rongeurs peuvent entraîner des catastrophes ferroviaires. Cela a été le cas lors de l'accident de train du 17 juillet 2014 à Denguin. Les rongeurs, en grignotant une partie des câbles électriques gérant la circulation du train sur le réseau, ont entraîné un faux contact activant ainsi un feu vert qui n'aurait pas dû l'être. Ainsi une collision entre un TER et un TGV a eu lieu et une quarantaine de personnes furent blessées.

L'industrie automobile est également victime de l'activité des rongeurs. En effet, le moteur des voitures constitue un terrain de grignotage idéal. Les protections autour des moteurs étant élaborées en substances biodégradables à base de céréales, les rongeurs provoquent de nombreux dégâts. Les garages estiment à l'heure actuelle qu'au moins deux véhicules par semaine sont en panne à cause du grugeage d'un rongeur.

### 3. Impacts écologiques

Les rongeurs sont également impliqués dans la disparition et l'extinction de nombreuses espèces indigènes, dans les écosystèmes qu'ils ont envahis et colonisés en dehors de leurs aires de répartition naturelles. Moore *et al* en 1992 ont montré que les rats, en milieu insulaire, auraient contribué à l'extinction de nombreuses espèces telles que des mammifères, des serpents, des geckos, des scinques, des batraciens, des escargots, des arthropodes ainsi que des oiseaux (10). A l'heure actuelle, on estime que les rats bruns sont responsables de la disparition d'une vingtaine d'espèces d'oiseaux dans le monde (3).

Une étude sur la prédation des graines par les souris dans une forêt de Nouvelle Zélande a montré que les souris consommaient la totalité des semences et avaient une implication néfaste sur la dynamique de population des arbres (11).

Angel *et al*, en 2009, ont examiné l'impact des souris sur des îles de l'océan Austral et ils ont constaté un impact négatif aussi bien sur la faune que la flore (12). Des recherches effectuées sur les îles de Gaugh dans l'océan Atlantique, qui abritent 20 espèces rares d'oiseaux, ont montré que les souris étaient responsables de l'échec de reproduction de ces oiseaux, ce qui a conduit à une chute préoccupante de leur population.

### 4. Impacts financiers

Comme nous l'avons dit précédemment, estimer l'impact financier global causé par les rongeurs est compliqué. A partir d'études réalisées aux Etats Unis, Battersby *et al* ont estimé que le cout engendré par la destruction de matériel était de 15\$ environ par rat (9). En considérant que le nombre de rats présents aux Etats Unis est d'environ 250 millions, les dommages engendrés par ces derniers atteignent des sommes considérables, et ce sans compter les coûts de traitement de dératisation.

A l'heure actuelle, la menace des rongeurs sur les milieux insulaires est un enjeu crucial et de nombreux plans de lutte contre les rongeurs voient le jour afin de protéger des espèces menacées. La mise en place de ces plans constitue un coût financier non négligeable.

Enfin, en grignotant les câbles électriques, téléphoniques ou de réseaux informatiques, les rongeurs peuvent aussi entraîner un arrêt partiel des chaînes de production, entraînant ainsi une perte financière conséquente pour les entreprises.

Les rongeurs causent donc de nombreux problèmes économiques, cependant l'impact sanitaire dû à leur présence doit également être pris en compte.

#### **D. Problèmes sanitaires**

Les rongeurs, et plus particulièrement les rats et les souris, sont décrits par l'Organisation Mondiale de la Santé comme représentant un risque important pour la santé humaine. En effet, ces rongeurs sont les vecteurs de graves maladies touchant l'homme. Leurs morsures, leurs excréments, et même leur pelage permettent la transmission de plus d'une quarantaine de maladies par la propagation de parasites (endo et ectoparasites), de bactéries et de virus (8). Parmi les maladies vectorisées directement par les rats et les souris, nous retrouvons les hantaviroses, la leptospirose, la peste et bien d'autres. Cependant nous nous attarderons sur ces 3 maladies dans les parties suivantes. Le grand potentiel des rats comme vecteurs de maladies est dû à plusieurs facteurs (8). Le premier de ces facteurs étant l'environnement dans lequel ils vivent. Ils vivent dans des milieux humides et sales tels que des égouts, des poubelles, qui sont propices à la contamination par des microorganismes pathogènes. Cependant, pour qu'il y ait risque sanitaire, cela nécessite la combinaison de deux paramètres qui sont : d'une part l'exposition aux pathogènes et d'autre part la possibilité de transmission à l'homme. Or, le rat et la souris fréquentent le milieu de vie de l'homme. Ils sont en contact direct avec l'homme ou tout au moins avec les objets qu'il utilise fréquemment, assurant la transmission de leurs pathogènes. Les rongeurs, de par leur taille, peuvent se faufiler partout et se propager rapidement à la surface du globe, avec leurs pathogènes. Et grâce à leur rythme de reproduction élevé, ils assurent une dissémination rapide de leurs pathogènes également. L'OMS considère que le rat présente un danger particulièrement élevé pour les personnes ayant une sensibilité accrue comme les enfants et les personnes âgées (9). Cependant, en ce qui concerne les hantaviroses, la leptospirose et la peste, ces maladies touchent n'importe quelle catégorie de personnes, quel que soit leur âge, et ont été responsables d'un grand nombre de morts.

## 1. Peste

L'animal en lien direct avec la peste est *Rattus rattus*. Le peste est ce que l'on appelle une maladie « mondiale » car elle a touché 3 continents : l'Afrique, l'Asie et l'Europe. Dans l'histoire, il s'est produit 3 grandes épidémies de peste : la peste Justinienne à l'Antiquité, la peste noire en 1348 et la peste responsable de la dernière pandémie en Chine à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle (13).

Cette maladie est due à un bacille : *Yersinia pestis*, découvert en 1894 à Hong Kong par M. Yersin. Ce bacille, long de 1 à 1,5 µm, immobile et encapsulé, possède une température optimale de croissance à 25°C. La survie dans l'environnement de ce bacille est très variable. Sur le sol il disparaît rapidement, mais il peut subsister des mois ou des années dans le terrier de rongeurs si les conditions sont propices. Cela explique d'ailleurs la persistance de cette maladie.

Cependant, la peste humaine n'est possible que par l'existence du trio « puce- rat- homme ». Il existe deux formes de peste : la peste bubonique et la peste pneumonique. La première est due à la pénétration cutanée du bacille par la pique d'une puce. Ainsi, le bacille entre dans la circulation sanguine, et au bout de 2 ou 3 jours, un ganglion apparaît, nommé le bubon. Les bactéries se disséminent par voies lymphatique et sanguine vers la rate, le foie, éventuellement les poumons, et provoque une septicémie pouvant entraîner alors le décès.

Dans certains cas, un abcès pesteux pulmonaire se forme chez le malade, et la maladie touche alors les poumons, devenant la peste pneumonique. Celle-ci peut se transmettre d'homme à homme sans l'intermédiaire de la puce, via des gouttelettes de salive projetées par la toux.

Dans le cas de la peste bubonique, le vecteur assurant l'épidémie est la puce. La puce, qui va transmettre le bacille *Yersinia pestis*, est *Xenopsylla cheopis*, puce du rat, mais qui à défaut de son hôte naturel vit aussi sur l'homme (14). Cependant, *Xenopsylla cheopis* n'est pas la seule puce responsable, il y en a bien d'autres, environ 220 genres. En effet, selon l'environnement et surtout la température, *Xenopsylla cheopis* ne peut survivre et le bacille choisira à défaut d'autres puces (14).

*Xenopsylla cheopis* vit dans la fourrure du rat, que ce soit *Rattus rattus* ou *Rattus norvegicus*, et elle va transmettre le bacille et donc la peste au rat. En effet, il faut tout de même garder à l'esprit que la peste est primitivement une maladie de rongeurs. Une fois le rat mort, les puces quittent leur hôte pour en trouver un nouveau. Cependant, puisque le rat noir vit à proximité de l'homme, c'est à ce moment que soit un rat soit un homme sera la proie de ces puces et pourra être contaminé par la peste bubonique.

Actuellement, le traitement curatif est basé sur la streptomycine. A l'origine, le taux de mortalité de la peste était de 93% mais, maintenant grâce aux antibiotiques, ce taux a été réduit à 16%.

A l'heure actuelle, la peste sévit encore dans quelques endroits dans le monde. Ainsi aux Etats Unis, en 2015, 11 cas de peste ont été déclarés dont 3 mortels. A Madagascar, où la peste fait encore des ravages, il y a entre 300 et 1200 cas chaque année avec 28% de mortalité.

## 2. Leptospirose

La leptospirose est une zoonose ubiquitaire de préoccupation mondiale. Elle est provoquée par des bactéries Spirochètes pathogènes du genre *Leptospira*. Cette zoonose touche aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement (15,16). Elle est présente sur tous les continents sauf l'Antarctique (15). La leptospirose peut être considérée comme une maladie ré-émergente (17,18) qui entraîne de nombreux problèmes économiques et de santé publique. La leptospirose a un réel impact économique car les leptospires peuvent infecter le bétail tel que les bovins ou les chevaux par exemple, et entraîner des échecs de leur reproduction (19). De plus, cette zoonose entraîne de nombreux autres problèmes économiques qui sont, à l'heure actuelle, en train d'être étudiés par un groupe de travail de l'OMS (<http://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/>). Du point de vue de la santé publique, le taux d'incidence de la leptospirose n'a cessé d'augmenter ces dernières années, et le nombre de cas graves estimé est d'environ 500 000 personnes infectées par an au niveau mondial (20). Dans le monde, il y a environ 0,1 à 1 cas pour 100 000 habitants par an, dans les zones ayant un climat tempéré, et plus de 10 cas pour 100 000 habitants dans les zones ayant un climat tropical (18). Cependant, l'incidence réelle de la leptospirose est fortement sous-estimée car la grande majorité des pays ne possède pas de systèmes de notification obligatoire des cas de leptospirose. L'incidence des cas de leptospirose n'est ainsi relevée que par les cas graves entraînant une hospitalisation et une demande de diagnostic de laboratoire. Donc, tous les autres cas qui n'entraînent pas une hospitalisation ne sont pas répertoriés (18). Des centaines de personnes décèdent chaque année de cette infection, le taux de létalité avoisine 10 % environ (21). La France métropolitaine a la plus forte incidence de leptospirose de Europe de l'ouest (22) avec 0,44 cas pour 100 000 habitants (23). En France, la surveillance de cette maladie est basée sur un système de rapport volontaire de la part des laboratoires gérés par le Centre National de Référence de l'Institut Pasteur Paris (CNR) (23). Le genre *Leptospira* peut être divisé en deux grands groupes sérologiques : le groupe

*Leptospira interrogans* (s.l) regroupant toutes les souches de leptospires pathogènes, et le groupe *Leptospira biflexa* (s.l) comprenant les souches saprophytes qui ne présentent aucun danger pour les humains. Ces deux groupes sont divisés en de multiples sérovars (16, 22). Les sérovars sont antigéniquement déterminés par l'expression des Lipopolysaccharides (LPS) sur leur membrane externe, et ces sérovars sont alors ensuite regroupés en sérogroupes. Ces sérogroupes n'ont pas de statut taxonomique mais sont utiles pour la compréhension épidémiologique (16,24). Il existe plus de 300 sérovars répartis dans 24 sérogroupes (25). Parallèlement, suite aux études d'hybridation ADN-ADN, une classification génomique a été établie avec actuellement 20 espèces décrites : 8 espèces pathogènes, 7 espèces saprophytes et 5 espèces dont la pathogénicité n'est pas clairement connue (26). Cependant, la classification sérologique et la classification génomique ne sont pas superposables.

Les leptospires sont des bactéries spirochètes minces, hélicoïdales et mobiles, d'environ 0,1 µm de diamètre et de 6 à 20 µm de longueur (15; 24) (figure 5). L'origine de la mobilité de ces bactéries provient de deux flagelles péri-plasmiques qui sont localisés à chaque extrémité de la bactérie (26). Leur membrane externe possède de nombreuses protéines telles que des LPS. Leur génome a une taille d'environ 5 000 kb et est composé de deux chromosomes : un chromosome de 4 400 kb et un second plus petit de 350 kb (24). Le génome des leptospires surpasse ceux des autres bactéries en terme de nombre de gènes codant pour des protéines (27). La taille importante de leur génome leur confère la capacité de vivre dans de nombreux milieux différents (25). Dans l'environnement, ces bactéries pathogènes survivent sur des sols humides ou dans de l'eau douce stagnante (19) pendant de longues périodes de temps, surtout si le pH est légèrement alcalin. Par ailleurs, elles vivent très bien dans des environnements à forte viscosité car elles peuvent s'agréger entre elles, ce qui augmente leur survie (20). Cependant les leptospires sont aérobies obligatoires (15, 24) et sont sensibles aux UV. En effet, elles ne possèdent pas de Super Oxyde Dismutase (SOD), ainsi elles n'ont pas la possibilité de lutter contre le stress oxydatif, par conséquent une exposition aux UV leur est fatale (28). Enfin, les leptospires ont un optimum de croissance à 28- 30°C (15,24).

Le pH, la salinité, la viscosité et la température sont donc des facteurs essentiels pour la survie des leptospires pathogènes (20).

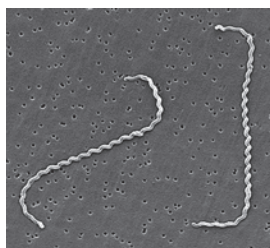


Figure 5: Photographie au microscope électronique de *L. interrogans*, sérovar *icterohaemorrhagiae* par Levett et al (24)

Les leptospires pathogènes vivent dans l'organisme de nombreux mammifères. Cependant, elles peuvent se retrouver à l'état libre dans l'environnement. Elles peuvent infecter de nombreux hôtes en traversant leurs muqueuses (telles que celles du nez, des yeux ou de la bouche), via une abrasion cutanée ou la peau humide (18,24). Une fois ces bactéries dans la circulation sanguine, elles se multiplient pendant une semaine et colonisent de nombreux organes tels que les reins (16,18).

La leptospirose humaine est une maladie qui peut être très variée dans son expression clinique. On peut observer des cas bénins quasi asymptomatiques ou exprimant simplement un syndrome grippal. Les formes plus graves peuvent être caractérisées par une insuffisance rénale aiguë ictérique (ou maladie de Weil) ou un syndrome hémorragique pulmonaire. La létalité est en moyenne de 10% mais peut être beaucoup plus élevée suivant la forme considérée (jusqu'à 50 % dans le cas du syndrome pulmonaire hémorragique sévère).

La sévérité de la maladie dépend de plusieurs facteurs, tels que le statut immunitaire individuel de l'hôte, le sérovar, et des facteurs liés à la relation hôte-sérovar qui ne sont pas encore connus à l'heure actuelle (15,18).

De nombreux traitements existent mais ils doivent être effectués au début de l'infection pour être efficaces. En cas de leptospirose de faible gravité, un traitement avec de la Doxycycline ou de l'Amoxiciline est suffisant (18,25). Il existe également des vaccins permettant de se prémunir face à la leptospirose. Toutefois à l'heure actuelle, les vaccins ont une efficacité faible car ils sont sérovars-spécifiques et ne peuvent pas offrir une protection à long terme. Le nombre important de sérovars existants ainsi que le coût élevé de production d'un vaccin multisérovants sont les principales limites de la vaccination (18,28).

Les leptospires ont deux types d'hôtes, les hôtes dits « accidentels » tels que l'homme, et des hôtes « réservoirs » (15,18,28) tels que les rongeurs. Les hôtes accidentels vont développer de nombreux signes cliniques et vont excréter des leptospires dans leur urine après la période de colonisation rénale et parfois pendant plusieurs semaines suivant la guérison (29). En revanche, les hôtes réservoirs ne vont pas développer de signes cliniques, mais vont excréter des leptospires dans leur urine pendant une très grande partie de leur vie (15,29). Le fait d'excréter des leptospires dans l'urine favorise la dissémination de ces bactéries dans l'environnement.

Les hôtes peuvent être contaminés, soit par transmission indirecte par contact avec un environnement contaminé par l'urine d'un animal infecté (15,16) soit par contact direct avec l'urine d'un animal infecté (20,24).

Les facteurs d'exposition aux leptospires sont multiples. Par le passé, dans les pays industrialisés, la leptospirose affectait surtout les personnes sur leur lieu de travail (30). En effet, les leptospires infectaient surtout les agriculteurs, les commerçants d'animaux, les vétérinaires, les égoutiers et les soldats (15,18,31). En revanche, depuis quelques années, d'autres catégories de personnes sont concernées par cette zoonose car d'autres facteurs sont majoritairement responsables de ces infections. Parmi ces facteurs, il y a notamment : les sports aquatiques tels que le rafting et le canoë-kayak (20,23,32), le jardinage (24), le fait de marcher pieds nus (24,33), ou encore de voyager à l'étranger dans des zones d'endémie (18). En France métropolitaine, la leptospirose devient ainsi plutôt une maladie de loisir. Dans les pays tropicaux, l'insuffisance sanitaire, le manque de ramassage des ordures et les inondations sont les facteurs responsables de la majorité des cas de leptospirose (21,31).

Pour se prémunir contre une infection, quelques moyens peuvent être facilement mis en place, tels que se faire vacciner, ou encore porter des gants, des lunettes et des bottes pour les travailleurs les plus exposés. De plus, des détergents sont mis dans les eaux usées des égouts, ce qui permet de réduire considérablement la survie des leptospires (24). Enfin, une gestion constante des populations de rongeurs est indispensable afin de réduire la dissémination des leptospires dans l'environnement et de diminuer les cas de leptospirose humaine (18). En effet, le rôle du rat brun comme source d'infection humaine aux leptospires a été découvert en 1917 (24). Le rat est un hôte réservoir des leptospires (17,29). Il existe une relation hôte-bactérie entre *Rattus norvegicus* et le sérotype *Icterohaemorrhagiae* (34).



Il a été montré que la prévalence de portage de leptospires au sein des populations de *Rattus norvegicus* est très élevée pour la leptospirose et ce rongeur est considéré comme le principal responsable des cas d'infections humaines de leptospirose (18,28,29). En France, le taux de prévalence estimé est de 34,7% chez le surmulot (35). Cela est directement dû à son mode de vie. Le rat est un commensal qui colonise tous les habitats humains et vit aussi au contact des leptospires. Il se nourrit des déchets et des sources alimentaires les plus diverses (36). En zone urbaine, les rats ont des territoires réduits et subissent une forte promiscuité synonyme d'agressivité, y compris avec les populations humaines, d'où un risque accru de transmission directe ou indirecte de la leptospirose (36).

### 3. Hantavirus

Les Hantavirus sont regroupés au sein de la famille des *Bunyaviridae* (37). Leur génome est composé de 3 molécules d'ARN simple brin avec une polarité négative. Ces 3 ARN simples brins codent respectivement pour la nucléoprotéine N, deux glycoprotéines d'enveloppe (Gn et Gc) et une RNA polymérase RNA dépendante. 22 espèces d'Hantavirus sont officiellement décrites mais le nombre de taxons décrits a augmenté récemment de manière importante. Une centaine d'espèces ou de variants dans l'espèce sont décrits actuellement. Les Hantavirus sont présents sur tous les continents. Ainsi, 5 espèces d'Hantavirus circulent sur le continent Européen : le virus Puumala (PUUV), le virus Seoul (SEOV), le virus Dobrava Belgrade (DOBV), le virus Saaremaa (SAAV) et le virus Tula (TUV) (37).

Chaque espèce d'Hantavirus est portée par un hôte spécifique (38), dont majoritairement des rongeurs. L'infection de l'hôte naturel (réservoir) se traduit par une infection chronique au cours de laquelle le virus persiste dans les organes. La durée de la virémie et de l'excrétion varie selon l'association Hantavirus-hôte. La transmission du virus entre les hôtes naturels se fera par contact direct (morsure) ou indirect par inhalation d'excrétas ou de sécrétions. De la même manière, les Hantavirus peuvent passer des rongeurs à l'homme. La transmission inter humaine est rare mais a cependant déjà été décrite au Chili.

Une fois l'homme infecté par le virus, 2 syndromes différents peuvent se développer. Dans le cas des Hantavirus asiatiques et européens, tel que le virus Seoul, l'individu infecté développe une fièvre hémorragique avec syndrome rénal : FHSR, avec un taux de létalité variant de 0.1% à 10%. Les Hantavirus américains, causent plutôt un syndrome pulmonaire, avec un taux de mortalité plus élevé allant de 30% à 60% (Institut Pasteur). Actuellement, le traitement de ces maladies est symptomatique, aucun traitement spécifique n'est disponible.

La prévention de l'infection consiste surtout à limiter le contact avec les rongeurs et leurs excréments.

Les hôtes réservoirs du virus Seoul sont *Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*. A cause de ses hôtes naturels, SEOV est le seul Hantavirus possédant une distribution potentiellement mondiale (39). SEOV a été retrouvé au Japon, en Corée du sud, en Egypte, aux USA, au Brésil, au Pays Bas et également en France, plus particulièrement à Lyon (37).

### **E. Bénéfices des rongeurs**

Les rongeurs, et plus exactement les rats et souris sont responsables de nombreux problèmes comme énoncé précédemment. Cependant, en écologie, tout être vivant interagit avec son environnement et possède un rôle. Les rongeurs n'échappent pas à ce principe, et les rats possèdent eux aussi leur importance.

Actuellement, dans les villes, les rats sont indispensables car ils participent à l'élimination des déchets organiques rejetés par notre société. A Paris, on estime aujourd'hui que les rats dévorent chaque jour l'équivalent de 800 tonnes de déchets. Sans cette activité, les canalisations d'eaux usées seraient en permanence bouchées. De plus, les rats jouent également un rôle majeur comme ressource alimentaire dans certains pays tels qu'en Asie, en Inde et en Afrique. En France, le rat a servi de réserve alimentaire lors du siège de Paris entre 1870 et 1871. Enfin, au Mozambique, des muridés du genre *Cricetomys* sont utilisés pour détecter les mines anti personnels. Pour terminer, les rats blancs d'élevage sont utilisés aujourd'hui en laboratoire pour divers tests et études capitales.

Le réel problème associé aux rongeurs est leur capacité de reproduction rapide, ainsi ils deviennent, en très peu de temps, incontrôlables. L'homme est en partie responsable, car en modifiant l'environnement, il a permis aux rats et souris d'obtenir de nouvelles niches écologiques favorables à leur développement. Cela a entraîné tous les problèmes énumérés. De ce fait, la gestion des rongeurs est actuellement indispensable. L'objectif n'étant pas une éradication complète de ces espèces mais un contrôle des populations de rongeurs. Pour cela de nombreux moyens existent aujourd'hui. Le mode de gestion est une problématique actuelle compliquée car certains de ces moyens de gestion entraînent des conséquences écologiques non négligeables.

## **F. Gestion des populations de rongeurs**

La gestion par l'homme des rongeurs a commencé dès le Néolithique, lorsque l'homme, devenu sédentaire a dû stocker sa nourriture. Dès lors, il a dû protéger ses denrées alimentaires des rongeurs. L'urbanisation se développant par la suite, cette gestion se complexifie et ne concerne plus seulement l'aspect alimentaire. La lutte contre les rongeurs dans les grands centres urbains existe depuis de nombreuses années. En 1841 déjà, le maire de New York était engagé dans cette lutte (8). De par leur mobilité et leur diversité importante d'habitats, les rongeurs en ville sont difficiles à gérer. Malgré toutes les techniques et nos connaissances actuelles, de nombreuses villes n'arrivent toujours pas à contrôler adéquatement leur population de rongeurs. Deux types de méthodes peuvent être mises en place : la lutte préventive et la lutte curative.

Concernant la lutte préventive, celle-ci consiste à empêcher les rongeurs de pénétrer, de circuler et de nidifier dans les bâtiments et d'avoir accès aux ressources en eau et nourriture. Les rats affectionnent les tas de débris et d'ordures, de ce fait, dans le cadre de la lutte préventive, il faut tenir les lieux de stockage de nourriture en parfait état de propreté. Les abords des bâtiments doivent également être bien entretenus. De plus, installer des grillages et utiliser du ciment lisse comme matériau de construction permettent de lutter contre une invasion potentielle de rongeurs. Cependant, il faut généralement y songer lors de la construction du bâtiment car sa mise en place ultérieure est difficile et onéreuse.

En ce qui concerne la lutte curative, elle consiste à utiliser contre les rongeurs des dispositifs physiques, biologiques ou chimiques.

La lutte curative va être développée dans cette partie.

### **1. Dispositifs physiques**

#### **a) Piégeage**

C'est une technique ancienne qui a une efficacité plutôt limitée. Elle permet de piéger seulement quelques individus. En cas de réelle infestation par une population de rongeurs, cette technique n'est pas suffisante. Parmi les pièges possibles, nous pouvons citer les nasses, les tapettes et les plaques de glue. L'avantage est que le corps de l'animal sera retrouvé, permettant ainsi une identification de l'espèce. Egalement, avec cette technique, il n'y a pas

de risque d'empoisonnement pour le manipulateur. En revanche, ces piègeages posent une réelle question sur la souffrance animale.

#### b) Ultrasons

Les rats et les souris sont sensibles aux ultrasons. Dans cette optique, des essais en utilisant des ultrasons ont été mis en place. Cependant, les résultats se sont révélés assez médiocres, car les sons sont atténués par les parois, les meubles etc... Actuellement, des essais utilisant des infrasons sont testés et semblent intéressants.

### 2. La lutte biologique

#### a) L'utilisation de germes pathogènes

En 1893, Daniz, chercheur à l'Institut Pasteur, isole dans le sang de rongeurs (de campagnols, de mulots et de souris), une salmonelle : la salmonelle enterica, appartenant au sérovar *Typhimurium*. Cette salmonelle contamine les animaux à sang chaud et provoque la mort d'un campagnol des champs en 5 à 6 jours. Cette méthode de lutte fut utilisée lors de la pullulation de 1912 qui toucha 25 départements. Cette lutte à grande échelle nécessita la mise au point de procédés de multiplication et de production du bacille en grande quantité. De 1923 à 1925, plusieurs hectares de cultures ont été traités en Normandie, puis en Belgique en 1937 avec un succès apparent. L'utilisation de cette méthode se poursuivit jusqu'au début des années 1960 puis fut définitivement abandonnée, du fait de résultats inconstants dans la nature, mais surtout due à l'observation de cas de mortalité chez des animaux domestiques et chez l'homme.

#### b) L'utilisation de prédateurs

L'utilisation de certains ennemis naturels des rongeurs semble être une idée judicieuse afin de gérer les populations de rongeurs, en théorie. Parmi les prédateurs des rongeurs, nous retrouvons les rapaces par exemple, ou encore les serpents. En pratique, l'utilisation de tels animaux est impensable en milieu urbain. Les chats domestiques ont toujours été utilisés comme ennemis des rongeurs. En effet, la domestication du chat par les Egyptiens fut motivée par le souci de protéger leurs réserves de céréales contre les dégâts commis par les rongeurs.

De nos jours, l'efficacité des chats est limitée, et ils s'attaquent beaucoup plus aux souris qu'aux rats. Cependant, la présence de chats semble tout de même agir de manière répulsive.

### 3. Lutte chimique

C'est la méthode de lutte la plus utilisée actuellement. Les rodenticides appartiennent à des familles chimiques très diverses. Tous les rodenticides à usage domestique font l'objet d'une réglementation stricte visant à limiter les risques toxiques pour l'homme. Cependant, certains détournements de produits à usage strictement réservé aux professionnels peuvent conduire à de graves intoxications (40). Les rodenticides peuvent être classés en deux catégories : les poisons violents et les anticoagulants.

#### a) Les poisons violents

Quelques exemples de poisons violents vont être décrits ci-dessous. Cependant, certains de ces produits, de par leur mode d'action, ne sont plus autorisés actuellement en Europe.

##### a)1) La Bromethaline

La bromethaline est un produit de synthèse appartenant au groupe des Diphénylamines (41). Sa structure chimique est : 2,4-dinitro-N-méthyl-N-[2,4,6-tribromophenyl]-6-[trifluorométhyl] benzenamine (42). Ses propriétés rodenticides ont été présentées pour la première fois en 1979. Après ingestion, la Bromethaline est rapidement absorbée. Elle subit ensuite une étape de N-déméthylation dans le foie pour former un métabolite : le desmethyl bromethaline. Ce métabolite est plus toxique que la molécule initiale. Ensuite, le desmethyl bromethaline et la bromethaline vont agir sur le système nerveux central (SNC) en provoquant un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ainsi, il y a une réduction de la synthèse d'ATP (42). En effet, la Chaîne Respiratoire Mitochondriale (CRM) continue de fonctionner mais l'ATP synthase est inhibée par le déficit du gradient électrochimique venant des H<sup>+</sup>. De par le manque d'ATP, les pompes Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> ATP dépendantes n'assurent plus leur rôle, entraînant une perte du contrôle osmotique dans la cellule et une entrée d'eau. Cette rétention d'eau augmente la pression sur les axones, entraînant ainsi une démyélinisation et une diminution de la transmission de l'influx nerveux. L'animal empoisonné souffre alors de graves problèmes neurologiques et meurt d'un arrêt respiratoire.

Ce produit ne possède pas d'antidote. Son usage a été interdit en Europe, mais est encore autorisé aux Etats Unis.

### a)2) La Crimidine

La crimidine fait partie de la famille des convulsivants, au même titre que les métaldéhydes et de la strychnine. La crimidine est un composé organique artificiel hétérocyclique présentant une analogie structurale avec la vitamine B6 (40). Une fois ingéré, ce rodenticide est rapidement absorbé par voie intestinale et accumulé dans le SNC, le foie et les reins. De par son analogie de structure avec la vitamine B6, la crimidine est un antagoniste de cette vitamine et a des conséquences importantes dans le SNC.

La vitamine B6 intervient comme co-facteur dans le métabolisme des acides aminés, ainsi que dans la réaction de phosphorylation du glycogène en glucose. Ainsi, la crimidine, inhibe le métabolisme du glucose menant à un déficit d'énergie dans le SNC.

De plus, la crimidine empêche la décarboxylation de l'acide glutamique en GABA (figure 6)



Figure 6 : Schéma du mode d'opération de la Crimidine

Ainsi, il y a une baisse de la concentration intracérébrale de GABA, menant à des crises convulsivantes chez l'animal intoxiqué, et entraînant sa mort.

### a)3) L'alphachloralose

L'alphachloralose est un composé organique artificiel provenant de la condensation d'une molécule de glucose avec une molécule de chloral anhydre en présence d'acide sulfurique (43). Ce rodenticide, également nommé chloralose ou gluchoral, fut découvert en 1889. Il fut d'abord utilisé en médecine humaine pendant de nombreuses années comme hypnotique et anesthésique (40). Son utilisation thérapeutique a complètement cessé depuis 1989 mais il sert maintenant de rodenticide, composé à 80% d'alphachloralose et de 20% de betachloralose. Il est utilisé sous forme de poudre ou d'appât dont les concentrations varient de 10% à 96%. Actuellement, de nouveaux appâts à 4% sont commercialisés.

Une fois ingéré, il est rapidement absorbé par voie intestinale et distribué au niveau hépatique. Il subit ensuite de nombreuses bio-transformations. Pour commencer, il subit une hydrolyse du chloralose en glucose et en chloral. Puis, le chloral est réduit en trichloroéthanol. C'est ce métabolite secondaire qui est toxique pour l'organisme. Le trichloroéthanol est ensuite distribué au niveau du SNC. L'alphachloralose a des propriétés à la fois dépressives et excitatrices. Ses propriétés dépressives entraînent un état comateux chez l'animal, ainsi qu'un abaissement de sa température corporelle. C'est cette hypothermie qui engendre la mort de l'animal. L'animal entre donc dans un coma hypothermique, qui est généralement interrompu par de brèves périodes d'agitation. Le chloralose possède donc 2 effets, un effet sédatif et un effet d'excitation motrice, d'où l'expression qui lui est attribuée : le cerveau engourdi et la moelle éveillée. En cas d'intoxication involontaire, le seul traitement repose sur une décontamination digestive. Le recours aux barbituriques est contre indiqué car ils risquent d'aggraver le coma et l'hypothermie. Sur le terrain, ce rodenticide possède une mauvaise appétence, le rendant donc peu consommé. Le second inconvénient est son efficacité qui est dépendante de la température extérieure. Le rongeur, en période estivale, n'entre pas en hypothermie et se réveille.

#### a)4) Le Cholecalciferol

Le cholécalciférol, également appelée vitamine D3, est utilisé pour l'hypercalcémie qu'il engendre chez les animaux (44). De par cette fonction, il est utilisé comme rodenticide. Une fois ingéré, le cholécalciférol est absorbé au niveau gastro-intestinal et transporté dans le sang vers le foie via des protéines de transport de la vitamine D. Au niveau hépatique, le cholécalciférol est métabolisé en 25-OH-cholécalciférol (calcifédiol), puis en 1,25-dihydroxycholéciferol (calcitriol) (44). C'est le calcitriol qui est le métabolite responsable de la toxicité de cholécalciférol. En effet, le calcitriol augmente l'absorption intestinale de calcium, et libère le calcium des os, provoquant ainsi l'hypercalcémie. De plus, il agit aussi en diminuant la synthèse d'hormones parathyroïdiennes, ce qui favorise l'augmentation de la phosphorémie dans le plasma. L'hypercalcémie a pour conséquences des troubles fonctionnels et organiques chez l'animal intoxiqué. Pour les troubles fonctionnels, il y a une diminution de l'excitabilité neuromusculaire, de la contractilité des muscles lisses, de la filtration glomérulaire par vasoconstriction de l'artère rénale afférente, ainsi que des troubles de l'excitabilité du myocarde et des perturbations de la sécrétion et de l'activité de certaines hormones. C'est notamment le cas de la vasopressine, l'hypercalcémie diminue l'influence de

la vasopressine sur les tubules rénaux, provoquant une augmentation de diurèse. Les troubles organiques se traduisent d'une part, par une action toxique directe du calcium sur les cellules épithéliales tubulaires rénales, mais aussi une dégénérescence des cellules spléniques, hépatiques et myocardiques. D'autre part, en raison de l'hypercalcémie et de l'hyperphosphatémie, des calcifications dystrophiques des tissus mous se forment dans les reins, les poumons, le myocarde et les gros vaisseaux. Toutes ces altérations mènent à la mort de l'animal.

#### a)5) Le Phosphure de zinc

Le phosphure de zinc est couplé à un appât afin d'être utilisé comme rodenticide. Il a été utilisé pour contrôler les populations de rongeurs mais il est maintenant interdit en Europe pour un usage en intérieur. L'utilisation en extérieur pour tuer notamment les taupes est autorisée. La toxicité du phosphure de zinc est liée à la production de phosphine (45). Les propriétés rodenticides de la phosphine ont été découvertes en 1933 par le docteur Freyberg. Une fois ingéré, le phosphure de zinc est hydrolysé, en condition acide, et la phosphine, sous forme gazeuse, est produite. Elle entre ensuite dans la circulation sanguine pour aller se stocker dans le foie, les poumons et le cœur. La phosphine va alors dénaturer l'oxyhémoglobine, interférer avec la synthèse de protéines, dont celle du cytochrome C oxydase, dans les cellules cardiaques et pulmonaires et inhiber la respiration oxydative mitochondriale (45). Cela entraîne alors des problèmes pulmonaires (oedème) et cardiaques menant rapidement à la mort de l'animal. Il n'y a pas d'antidote spécifique connu actuellement.

#### a)6) La Norbormide

La norbormide a été découverte en 1960 et a la particularité intéressante de tuer spécifiquement les rats (46). En effet les rats sont 150 fois plus sensibles que les souris. Une étude menée par Ravindram *et al* en 2009 a essayé d'expliquer ce phénomène. Leur hypothèse était qu'un métabolite de la norbormide était formé par la microflore des rats et c'était ce métabolite qui était responsable de la mort des rats. Cependant, l'auteur n'a pas réussi à prouver son hypothèse. Quoiqu'il en soit, la norbormide provoque une vasoconstriction des petites artères périphériques et une vasodilatation des artères systémiques de gros calibre, entraînant des problèmes cardiaques (46). Ce rodenticide est peu utilisé actuellement, notamment à cause de sa mauvaise appétence.



L'utilisation des poisons violents est soumise à de nombreuses restrictions car ils sont dangereux à utiliser près des lieux de stockage des denrées alimentaires ou des lieux d'habitation. Etant des poisons violents ils représentent un réel danger pour les hommes et la faune non cible. En effet, un défaut majeur de ces produits est qu'il n'existe pas d'antidote spécifique, avec une action rapide, nécessaire pour contrer une intoxication accidentelle. De plus, le second défaut est leur mode d'action qui engendre une mort violente et très rapide. Cela a pour effet de rendre méfiant la colonie de rongeurs, surtout les populations de rats. Ainsi, quelques individus de la colonie vont manger le poison et mourir. Les autres individus vont faire le lien entre l'appât consommé et la mort de leurs congénères, et ne consommeront pas les appâts. Pour ces raisons, les poisons violents sont peu utilisés maintenant. On leur préfère aujourd'hui des rodenticides à action retardée comme les anticoagulants antivitaminique K (AVKs).

#### b) Les AVKs

La lutte contre les rongeurs est une tâche complexe, du fait de leur comportement néophobe et d'éviction alimentaire. En effet, les rats sont de nature néophobe, ils se méfient de tout ce qui est nouveau dans leur environnement. Leur comportement d'éviction alimentaire signifie que seuls quelques rats vont goûter les nouvelles sources de nourriture et s'ils développent des signes cliniques rapidement, les autres individus du groupe associeront la nouvelle source de nourriture à la mort de leurs congénères et ne consommeront plus le produit (47). Cependant, les AVKs, grâce à leur mode d'action, vont différer la mort de l'animal de 3 ou 4 jours, évitant ainsi le comportement d'éviction alimentaire. Différentes molécules sont commercialisées en France, mais les AVKs sont de loin les produits les plus fréquemment utilisés. L'utilisation des AVKs comme rodenticides a débuté après la seconde guerre mondiale. Les AVKs sont des molécules destinées à empêcher ou à retarder la coagulation sanguine. Ils provoquent ainsi des hémorragies.

Les AVKs constituent une part importante de cette revue bibliographique. Leur découverte, ainsi que leur structure et leur mode d'action seront développés par la suite plus en profondeur dans une partie qui leur est consacrée.

Les AVKs vont entraîner des troubles de la coagulation, provoquant ainsi la mort des rongeurs intoxiqués.

## II. La coagulation

La coagulation est un processus indispensable à la vie et est un des éléments de l'hémostase. L'hémostase constitue l'ensemble des mécanismes concourant à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux : en arrêtant les hémorragies d'une part et en empêchant les thromboses d'autre part.

Tableau 1: Facteurs intervenant dans les phénomènes thrombogènes et antithrombogènes.

<b>Facteurs thrombogènes</b>	<b>Facteurs antithrombogènes</b>
Facteur de coagulation	Plasminogène
Plaquette	Antithrombine
Facteur d'activation plaquettaire	Protéine C
Facteur de Van Willebrand	Protéine S
Facteur tissulaire	TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)
Fibrinogène	Facteur d'activation du plasminogène (t-PA, urokinase)

Les différents protagonistes de l'hémostase sont cités dans le tableau 1 et sont présents dans la circulation en équilibre (figure 7).

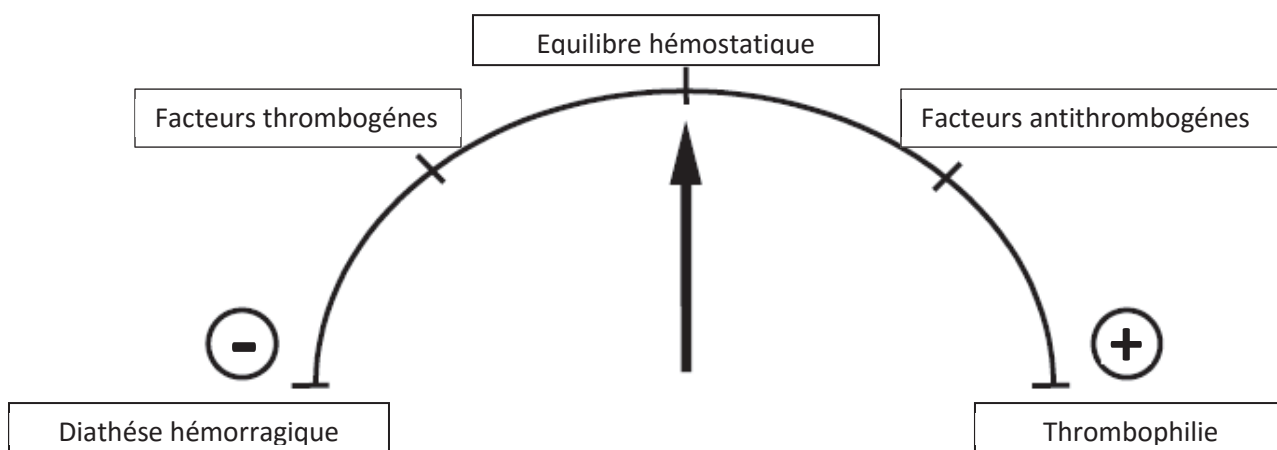


Figure 7 : Schéma représentant l'équilibre hémostatique

L'hémostase peut être déclinée en 3 étapes successives (figure 8) :

- L'Hémostase Primaire.
- L'Hémostase Secondaire ou coagulation plasmatique.
- L'Hémostase Tertiaire ou fibrinolyse.

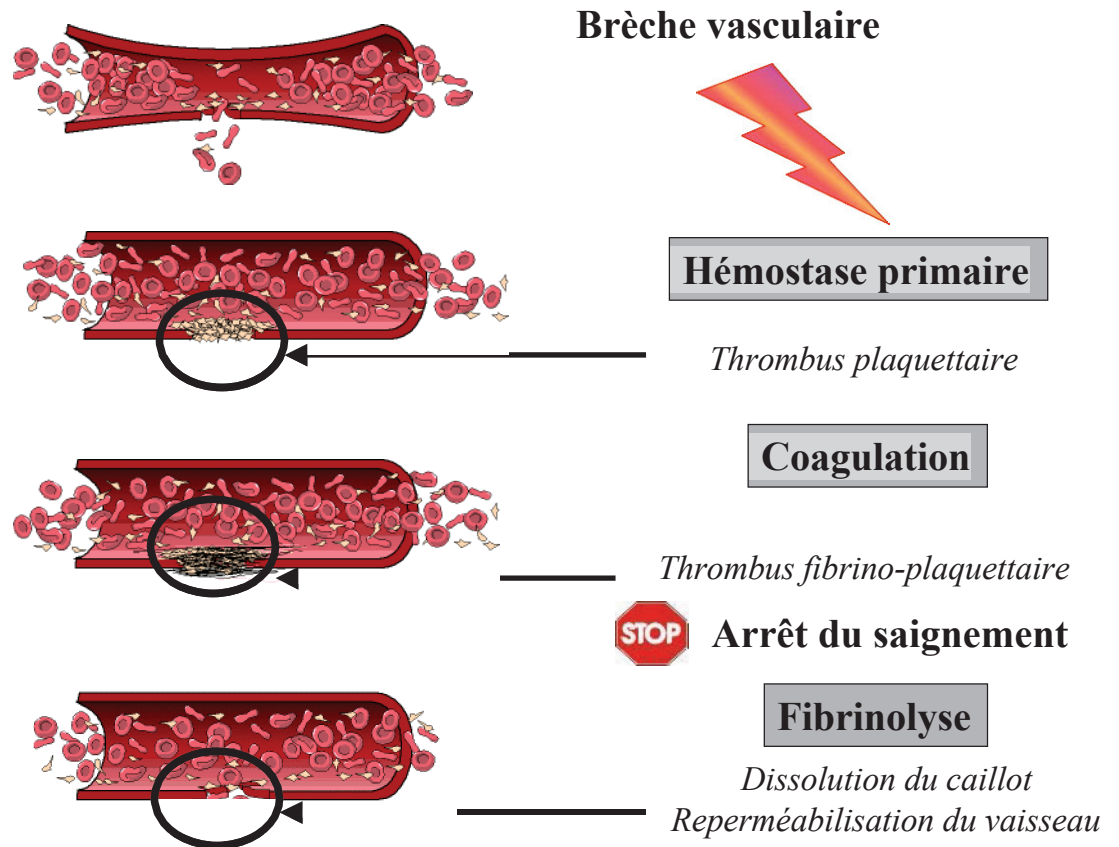


Figure 8 : Les différentes étapes de la coagulation (polycopié de M. Moerloose et Madame Boehlen)

## A. Hémostase Primaire

L'hémostase primaire est la première étape ayant pour but d'obstruer la brèche vasculaire en formant un thrombus plaquettaire. Le clou plaquettaire est formé dans les 3 à 5 minutes suivant la lésion de l'endothélium vasculaire. Ce thrombus plaquettaire est ensuite consolidé lors de l'étape de l'hémostase secondaire.

### 1. Les acteurs majeurs de l'Hémostase Primaire

Les acteurs permettant cette hémostase primaire sont : les cellules endothéliales, les plaquettes, le facteur de Von Willebrand et le fibrinogène.

- Les cellules endothéliales : toutes les parois vasculaires de l'organisme sont constituées de 3 couches : l'adventice, la média et l'intima (figure 9). La média est plus ou moins développée selon le type de vaisseau. Dans le cas d'une artère, la média est très développée. Elle est riche en fibres musculaires permettant les phénomènes de vasoconstriction. L'intima, quant à elle, est formée d'une couche constituée de cellules endothéliales séparées du sous endothélium par la membrane basale. Le sous endothélium possède des microfibrilles constituées d'un type de collagène très thrombogène. Il est le lieu de l'adhésion des plaquettes et de l'activation de la coagulation. Les cellules endothéliales possèdent des propriétés de synthèse très importantes : elles vont notamment synthétiser le facteur de Von Willebrand, la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), la thrombomoduline (permettant l'activation de la protéine C), l'activation du plasminogène (t-Pa) et l'inhibiteur du plasminogène (PaI).

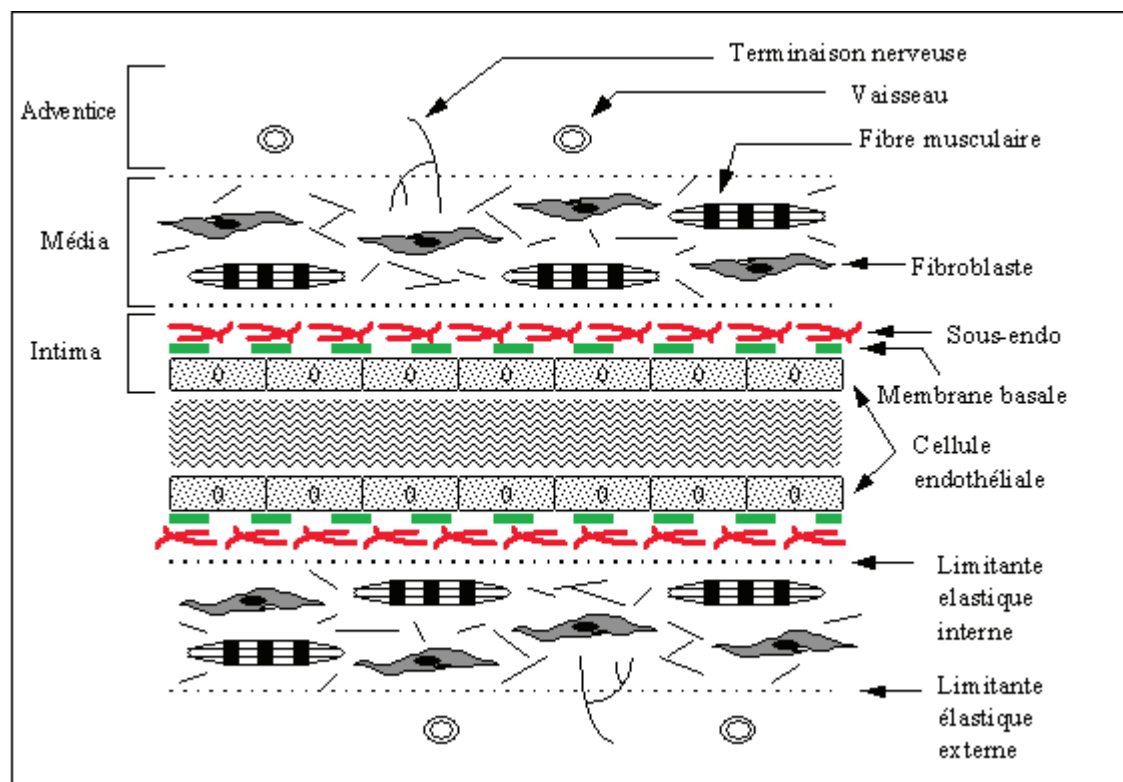


Figure 9 : Structure de la paroi vasculaire (polycopié de J.F.Schved)

- Les plaquettes : également nommées thrombocytes, sont synthétisées dans la moelle osseuse. Leur durée de vie est relativement courte, entre 4 et 8 jours. Ce sont des éléments de forme discoïde, de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre et dépourvus de noyaux (figure 10). Le taux normal de plaquettes chez l'adulte est de 150000 à 300000 / $\mu\text{l}$ . Elles sont

formées d'une membrane composée d'une double couche de phospholipides répartis de façon asymétrique. Les phospholipides anioniques sont prédominants à l'intérieur de la plaquette et seront externalisés lors de l'étape d'activation plaquettaire. Cette membrane est riche en cholestérol, en calcium, en glycoprotéines : notamment GPIB et GPIIb-IIIa et en récepteurs tels que les récepteurs pour le facteur de Von Willebrand, le fibrinogène et aussi celui de la thrombine. Les plaquettes possèdent également un réseau de microtubules et de microfilaments maintenant leur forme discoïde au repos. Enfin, elles possèdent aussi un cytoplasme riche en granules : des granules denses riches en calcium, ATP, ADP et en sérotonine et des granules alphas contenant le facteur de Von Willebrand et le facteur IV. Ces granules peuvent libérer leur contenu rapidement et en grande concentration là où se déroule le processus de coagulation.

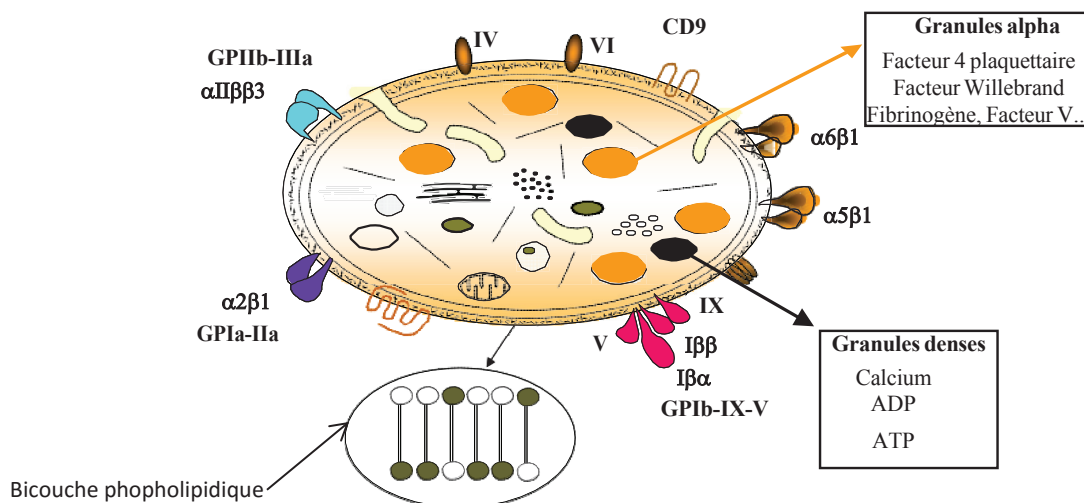


Figure 10 : Schéma d'une plaquette (polycopié de M. Moerloose et Madame Boehlen)

- Le facteur de Von Willebrand (du nom du docteur Erik Von Willebrand, médecin finlandais qui l'a découvert en 1926) : est une glycoprotéine multimérique du plasma jouant deux rôles essentiels: transporteur du facteur VIII, cofacteur de la coagulation, et médiateur de l'adhésion puis de l'agrégation des plaquettes lors d'une lésion vasculaire. Il est synthétisé par les cellules endothéliales ainsi que par les plaquettes.
- Le fibrinogène : cette molécule est un dimère. Chaque dimère est composé de 3 chaînes : alpha, bêta et gamma. La molécule de fibrinogène possède un domaine

central E et deux domaines latéraux D. Le fibrinogène possède un rôle crucial lors de l'hémostase primaire et secondaire.

L'hémostase primaire se déroule en deux phases : la phase vasculaire dans un premier temps et la phase plaquettaire dans un second temps.

## 2. La phase vasculaire

Lorsque le vaisseau est lésé, une vasoconstriction réflexe, liée à l'élasticité de la paroi vasculaire, va alors avoir lieu. Ensuite, cette vasoconstriction devient active suite à la contraction des fibres musculaires lisses de la média. Cette vasoconstriction a pour effet de ralentir l'écoulement du sang et de regrouper les plaquettes et les protéines coagulantes au niveau de la lésion. Une fois que le sang atteint le sous endothélium thrombogène, la phase plaquettaire peut alors débuter.

## 3. La phase plaquettaire

La phase plaquettaire est divisée en trois actions successives de la part des plaquettes : tout d'abord l'adhésion des plaquettes sur le sous endothélium, puis l'activation des plaquettes et enfin leur agrégation (figure 11).

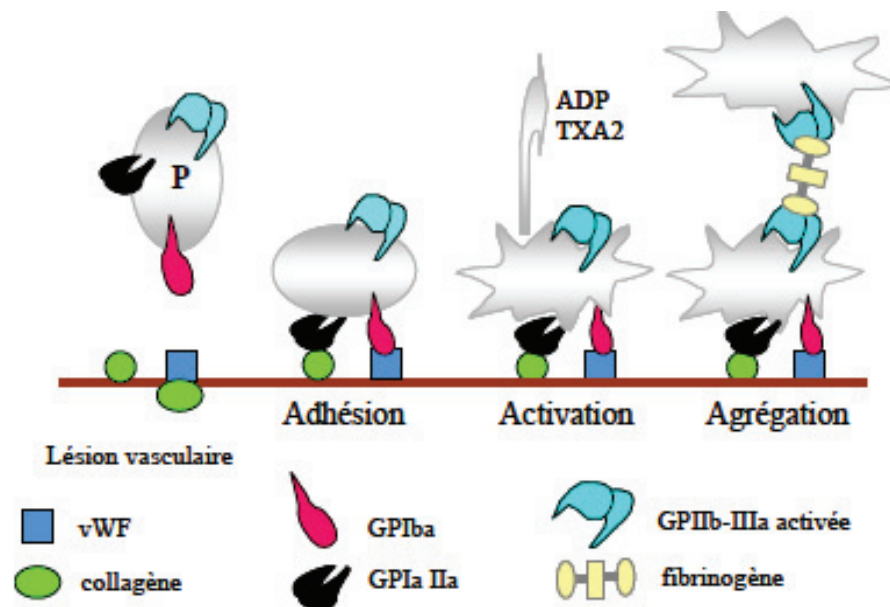


Figure 11 : Étapes de la phase vasculaire (polycopié de M. Moerloose et Madame Boehlen)

#### a) L'adhésion plaquettaire

Les plaquettes, dès leur sortie du vaisseau lésé vont adhérer à la structure sous endothéliale mise à nue par la brèche vasculaire. L'endothélium va exprimer les facteurs de Von Willebrand à leur surface qui auront un rôle d'ancrage pour les plaquettes, qui s'y fixeront par le biais de leur récepteurs GPIb. Une première couche monocellulaire de plaquettes va ainsi se constituer.

#### b) Activation plaquettaire

Suite à l'adhésion, les plaquettes vont s'activer, entraînant un changement de leur forme : de discoïde, elles passeront à une forme sphérique. Elles vont ensuite émettre des pseudopodes permettant d'augmenter leur surface membranaire afin de recouvrir au mieux la lésion. Elles vont ensuite exprimer les récepteurs GPIIb/IIIa de surface et sécréter le contenu de leur granules alpha et denses. Ainsi, la sérotonine et l'adrénaline aux propriétés vasoconstrictrices seront relâchées, également le facteur plaquettaire ou thromboplastine, qui favorise la coagulation et l'exposition des récepteurs membranaires GPIIb/IIIa, l'ADP et le thromboxane A2 capables d'activer à leur tour les autres plaquettes sanguines environnantes et de stimuler l'agrégation plaquettaire.

#### c) L'agrégation plaquettaire

Sur la première couche de plaquettes se fixent alors d'autres plaquettes activées. Pour cela, les récepteurs de surface GPIIb/IIIa vont subir une modification conformationnelle leur permettant de fixer le fibrinogène, en présence de calcium. Ainsi, grâce au fibrinogène, des ponts entre les plaquettes se forment, créant ainsi le premier thrombus dit thrombus blanc. Ce thrombus blanc a pour rôle d'arrêter au mieux les pertes sanguines. Cependant, ce thrombus blanc est fragile, il devra être consolidé par la suite lors de l'Hémostase Secondaire.

Pour finir, lors de l'agrégation plaquettaire, grâce à l'action d'une flipase, il y a une inversion de l'orientation des phospholipides anioniques membranaires des plaquettes, en particulier des phosphatidyls sérines. Ainsi, lors de l'hémostase secondaire, les phosphatidyls sérines permettront à certains facteurs de coagulation de venir se fixer spécifiquement aux plaquettes activées par le biais du calcium.

## **B. L'Hémostase secondaire**

L'hémostase secondaire, également appelée coagulation plasmatique, a pour objectif de renforcer le thrombus blanc en convertissant le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Les mailles de fibrine vont emprisonner les cellules sanguines circulantes, notamment les globules rouges, formant ainsi le thrombus rouge. Les facteurs de coagulations ont un rôle primordial lors de cette étape de coagulation plasmatique, car ils sont directement responsables de la conversion du fibrinogène en fibrine. La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à l'activation progressive des différents facteurs de coagulation et menant à son terme à la production de fibrine.

### **1. Les facteurs de coagulation**

Les facteurs de coagulations sont synthétisés, pour la plupart, dans le foie, et sont divisés en 3 catégories : en pro-enzymes ou zymogènes de serine protéases : les facteurs II, VII, X, XI, et XII ; en cofacteur : facteur V et VIII et en substrat : le fibrinogène (facteur I). Ces facteurs de coagulation sont résumés dans le tableau 2. Il existe toujours au moins deux formes pour ces facteurs : une forme non active tel que le facteur X et une forme active avec le suffixe « a », tel que le facteur Xa. Chaque facteur à l'état activé pourra à son tour soit activer un autre facteur, soit modifier certaines protéines impliquées ou non dans la coagulation. Certains des facteurs de coagulation portent des résidus gamma-carboxylés. La gamma carboxylation de ces résidus est très importante car elle leur permet de fixer le calcium. En effet, grâce à l'action de la flipase, le calcium circulant va tout d'abord se fixer aux phosphatidyls sérines des membranes plaquettaires. Par la suite, via le calcium, les facteurs de coagulation portant des résidus gamma carboxylés, pourront à leur tour se fixer aux membranes plaquettaires. Le calcium possède donc un rôle primordial permettant aux facteurs de coagulation de se fixer et de se concentrer localement.

La gamma carboxylation est réalisée par une gamma glutamyl carboxylase (GGCX), cette réaction nécessite la présence d'un cofacteur qui est la vitamine K hydroquinone. Ces facteurs sont donc appelés des facteurs vitamine K dépendants. Il s'agit des facteurs II, VII, IX et X. En cas de carence en vitamine K hydroquinone, ces 4 facteurs ne seront pas gamma carboxylés. Il circule alors dans le sang des substances appelées PIVKA (protein induced by vitamin K absence), les PIVKA II, VII, IX et X. Ce sont des précurseurs non carboxylés, donc inactifs car leur liaison aux phospholipides membranaires, via le calcium, est impossible.



Tableau 2 : Résumé des différents facteurs de coagulation

Numéro du facteur	Nom du facteur	Demi-vie
I	Fibrinogène	4 à 6 jours
II	Prothrombine	3 à 4 jours
III	Facteur tissulaire	
IV	Calcium ionisé	
V	Proaccéléline	12 à 36h
VII	Proconvertine	4 à 6h
VIII	Facteur antihémophilique A	10 à 16h
IX	Facteur antihémophilique B	24h
X	Facteur de Stuart Prower	1 à 2 jours
XI	Facteur Rosenthal	1 à 2 jours
XII	Facteur Hageman	2 à 3 jours
XIII	Facteur Laki-Lorand (stabilisant la fibrine)	3 à 7 jours

## 2. Déroulement du processus de coagulation

La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la formation de fibrine insoluble. L'enzyme clé permettant la transformation du fibrinogène en fibrine est la Thrombine : le facteur II. L'activation du facteur II en IIa découle de la voie exogène et endogène.

## La cascade de la coagulation

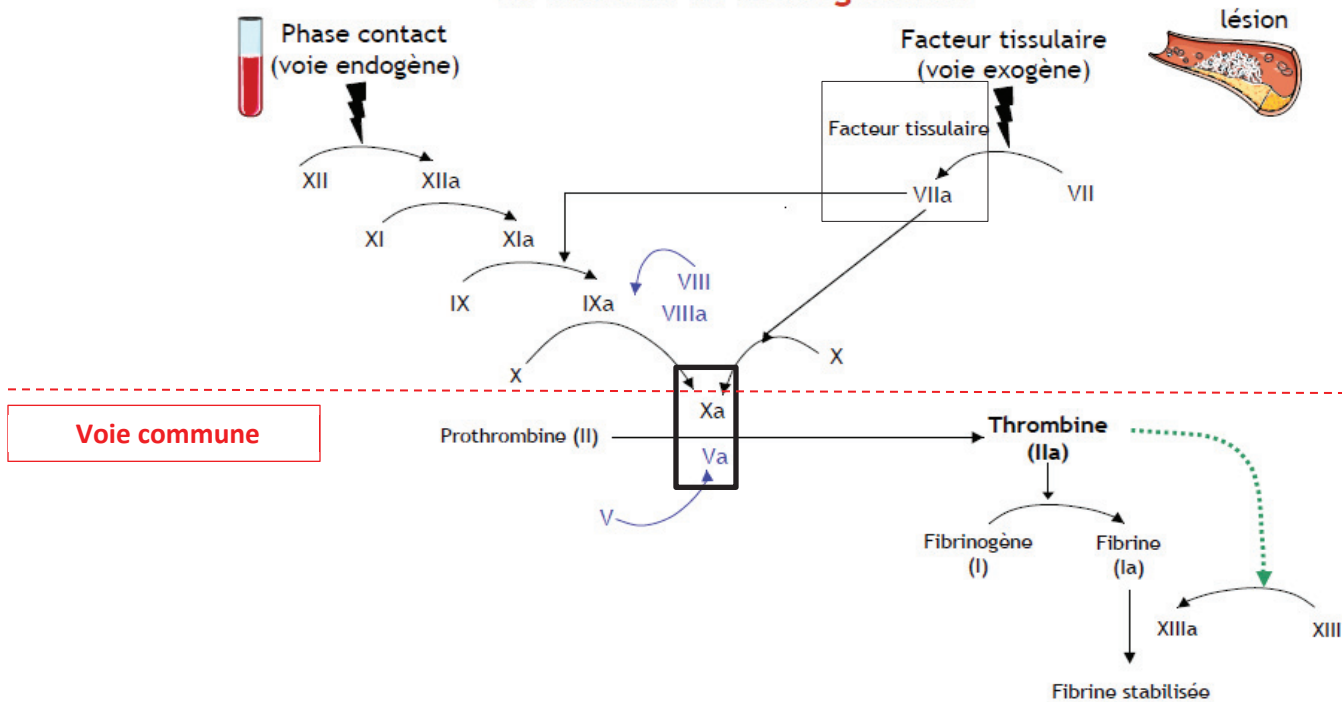


Figure 12 : Représentation de manière simplifiée de la cascade d'activations menant à la formation de fibrine (polycopié de M. Richard)

### a) La voie du Facteur tissulaire

Cette voie est déclenchée par la libération du facteur tissulaire. Ce dernier est normalement absent de la circulation sanguine, mais il est exprimé au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire et des fibroblastes. Il est donc exposé lors de la brèche vasculaire. C'est une protéine membranaire de très forte affinité pour le facteur VII. Lorsque le facteur tissulaire entre en contact avec le sang, il se complexifie avec le facteur VII circulant et permet ainsi l'activation du facteur VII en VIIa (en présence de calcium). Le facteur VIIa active à son tour le facteur X en Xa. La suite de la cascade de coagulation correspond à la voie commune avec l'activation du facteur X comme base.

### b) La voie endogène de la coagulation ou « système contact »

Pour la voie endogène, tous les éléments nécessaires à la coagulation sont présents dans le plasma, sans besoin d'apport extérieur. Celle-ci se caractérise par une activation en cascade de plusieurs facteurs plasmatiques au contact de l'endothélium lésé et en présence d'ions

calciques. Cette voie s'active lorsque le facteur XII entre en contact avec la surface « mouillable » chargée négativement, qui entraîne un changement de conformation en facteur XIIa. Ensuite, le facteur XIIa active à son tour le facteur XI en XIa qui active le facteur X en Xa en présence d'ions calciques.

c) La voie commune de la coagulation

Le facteur Xa adsorbé à la surface des phospholipides d'origine tissulaire ou plaquettaire s'associe avec le facteur Va pour former le complexe prothrombinase (en présence d'ions calciques). Ce complexe prothrombinase active le facteur II en IIa : en thrombine. La thrombine est une enzyme dont le substrat principal est le fibrinogène. La thrombine, en dehors de son rôle pour le fibrinogène, catalyse également sa propre activation en favorisant la génération du facteur Va, du VIIIa, du IXa et du facteur XIIIa qui a comme rôle majeur la stabilisation du caillot.

La thrombine : IIa clive sur la molécule du fibrinogène, deux petits peptides (A et B), libérant ainsi les sites de liaison et formant un monomère de fibrine. Ensuite, les monomères de fibrine s'organisent en réseau instable. Le réseau de fibrine est stabilisé par la suite, par les liaisons covalentes générées par le facteur XIIIa.

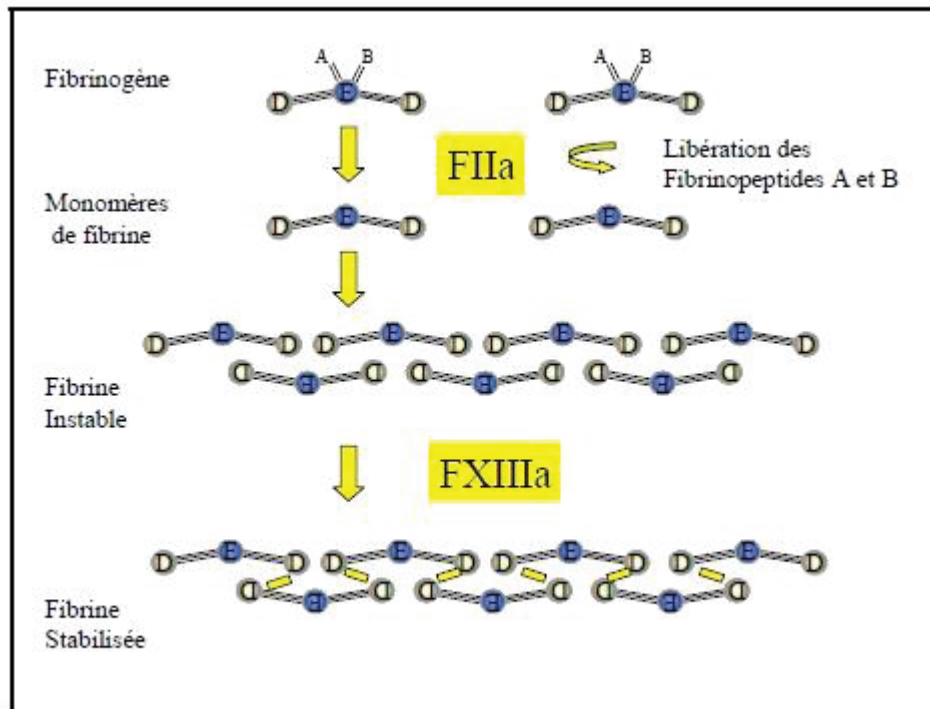


Figure 13 : Schéma du mécanisme de transformation du fibrinogène en fibrine insoluble (copié de J.F.Schved)

Dès que la thrombine apparaît, le processus de coagulation s'amplifie. En quelques secondes se forme un réseau de fibrine stable et insoluble qui emprisonne les globules rouges pour former le thrombus rouge.

#### d) Système de régulation de la coagulation

Dans le plasma, il existe plusieurs systèmes anticoagulants physiologiques dont le rôle est de maintenir l'équilibre hémostatique en contenant les réactions pro-coagulantes à un niveau basal. De plus, lors d'un épisode de coagulation, il est très important pour l'organisme que les enzymes formées lors de l'activation de la coagulation ne circulent pas dans le plasma, car elles risqueraient d'entraîner un processus pathologique grave. Afin d'éviter ce phénomène, chaque facteur activé va être par la suite inactivé. Trois systèmes d'inhibition sont connus actuellement : le système de l'antithrombine, le système protéine C- protéine S et le TFPI.

- Le TFPI (tissue factor pathway inhibitor): est capable d'inhiber le complexe facteur VIIa- facteur tissulaire, permettant ainsi d'inhiber l'activation du facteur X lors de l'activation de la voie du facteur tissulaire.

- La protéine C-protéine S : la protéine C est présente dans le sang sous forme inactive. Elle est activée par le complexe thrombine- thrombomoduline. La protéine C va ensuite former avec la protéine S un complexe puissant inhibant les facteurs Va et VIIIa. La protéine S circule dans le sang soit à l'état libre (40%), soit liée à une protéine. En se complexant avec la protéine C, elle optimise l'action anticoagulante de la protéine C. Les protéines C et S sont des protéines vitamine K dépendantes nécessitant une gamma-carboxylation pour être fonctionnelles.
- L'antithrombine, synthétisée par les cellules de l'endothélium vasculaire, inhibe principalement la thrombine (facteur IIa) et le facteur Xa. Elle va également inhiber un peu moins efficacement le facteur IXa et XIa. Son action anticoagulante est considérablement augmentée par l'héparine.

Il faut également signaler l'action de la protéine Z. Cette protéine a été identifiée en 1977 et isolée en 1984 (48). Son rôle enzymatique n'est pas clairement identifié, cependant la protéine Z est un cofacteur de ZPI, une protéase du facteur Xa. Cette protéine Z est également une protéine vitamine K dépendante.

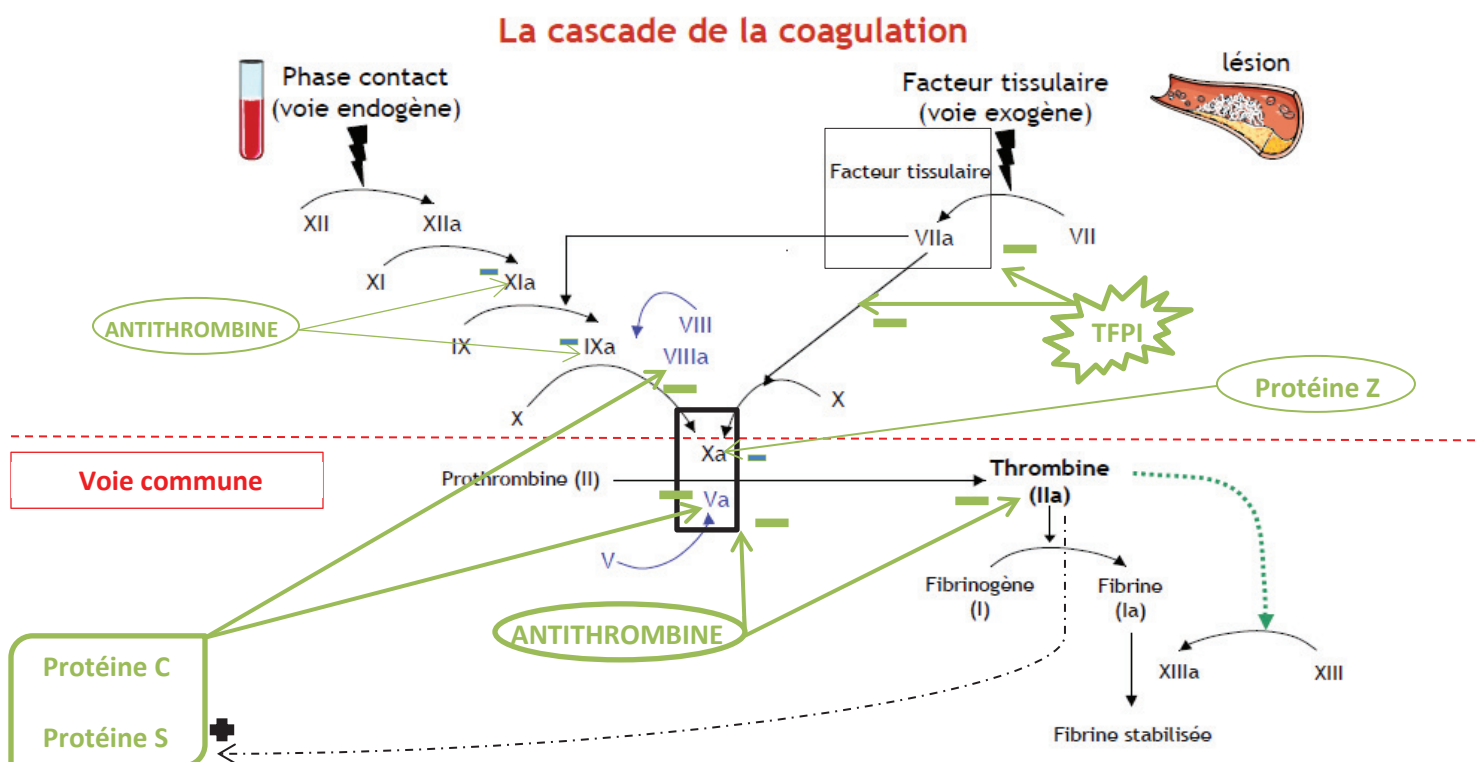


Figure 14 : Schéma représentant la régulation de la coagulation par l'action de 3 mécanismes inhibiteurs (en vert) (polycopié de M. Richard)

### C. L'Hémostase tertiaire ou Fibrinolyse

La fibrinolyse est le 3ème temps de l'hémostase. C'est un processus enzymatique visant à dissoudre la fibrine. Elle tend ainsi à empêcher l'installation mais surtout l'extension du caillot en détruisant les polymères de fibrine. La fibrinolyse, comme pour la coagulation plasmatique, va être régulée via des activateurs et des inhibiteurs (figure 15).

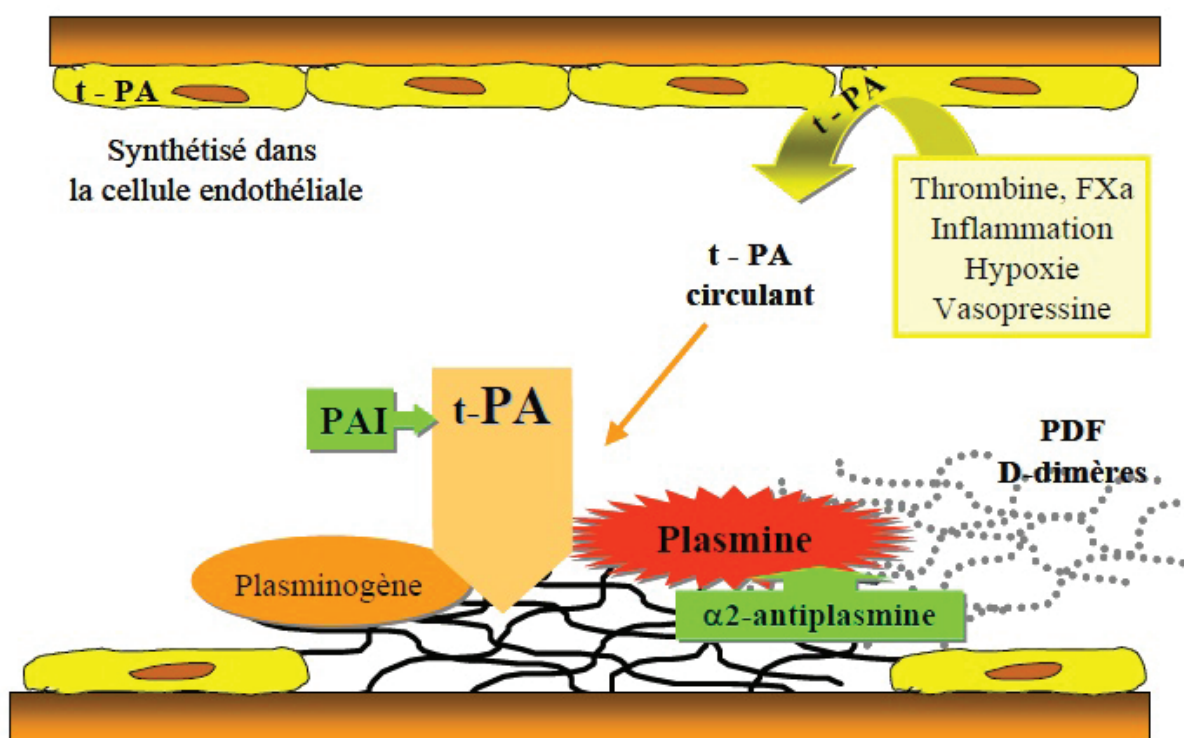


Figure 15 : Schéma de l'étape de fibrinolyse (polycopié de M. Moerloose et Madame Boehlen)

La fibrinolyse fait intervenir un précurseur inactif circulant dans le plasma : le plasminogène, synthétisé au niveau hépatique. Sous l'influence d'activateurs, le plasminogène est transformé en plasmine. La plasmine est une enzyme protéolytique très puissante capable de dégrader la fibrine du caillot, mais également le fibrinogène.

La transformation du plasminogène est contrôlée par deux activateurs :

- L'activateur du plasminogène (t-PA) : lors de tout phénomène lésionnel, le t-PA est synthétisé par les cellules de l'endothélium vasculaire, qui le libèrent sur le site du caillot. Le t-PA va ensuite activer le plasminogène en plasmine.
- La pro-urokinase (U-PA) : est synthétisée sous forme inactive par les cellules épithéliales du glomérule rénal. La pro-urokinase s'active en urokinase au contact du

caillot et en présence de thrombine. L'urokinase transforme ensuite le plasminogène en plasmine.

La fibrinolyse est régulée par deux types d'inhibiteurs :

- Les inhibiteurs de la plasmine : l' $\alpha$ 2antiplasmine et l' $\alpha$ 2macroglobuline. La plasmine libre n'est pas normalement trouvée dans le plasma, car en plus de dégrader la fibrine et le fibrinogène, la plasmine peut également dégrader d'autres protéines. De ce fait, une fois son rôle joué, la plasmine est immédiatement complexée avec l' $\alpha$ 2antiplasmine.
- Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène : le PAI-1 qui inhibe essentiellement le t-PA et le PAI-2 qui inhibe l'urokinase.

Au niveau du caillot, la plasmine générée se fixe sur la fibrine et la lyse, produisant ainsi des fragments très hétérogènes appelés PDF pour : produits de dégradation de la plasmine. Certains de ces PDF sont capables d'inhiber la formation de fibrine et l'agrégation plaquettaire.

L'Hémostase est un processus physiologique complexe dont les acteurs primordiaux sont les facteurs de coagulation. Quatre de ces facteurs (II, VII, IX et X) ainsi que les protéines C, S et Z sont des protéines vitamines K dépendantes. La vitamine K a donc un rôle prépondérant dans la coagulation.

### **III. La vitamine K**

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre, mais qui sont nécessaires à l'organisme. Les animaux supérieurs n'ont pas la capacité de produire ces vitamines. Elles doivent donc être fournies par l'alimentation, ou par leur microflore digestive. La vitamine K est essentielle pour l'organisme. En effet, elle permet une modification post traductionnelle très particulière de certaines protéines, la gamma carboxylation, leur permettant de se lier au calcium. Cependant l'approvisionnement digestif en vitamine K réduite est très inférieur aux besoins liés à la gamma carboxylation des protéines. L'organisme a donc mis en place un système permettant de renouveler constamment son stock de vitamine K.

#### **A. Découverte**

La découverte de la vitamine K, comme de nombreuses découvertes, fut fortuite. Elle eut lieu à l'occasion de recherches sur le métabolisme du cholestérol, en 1929, par deux danois : Carl Peter Henrik Dam et Schönheyder. A cette époque, ces deux scientifiques étudiaient les maladies en rapport avec des carences alimentaires, ressemblant au scorbut, chez les poulets (49). Dam entreprit de nourrir des poulets avec une alimentation pauvre en lipides et en cholestérol, et il constata l'apparition d'hémorragies sous cutanées et intramusculaires. Cependant, en comparaison avec le scorbut, les signes cliniques persistaient même après administration d'acide ascorbique. Cela le conduisit à la recherche d'un nouveau facteur anti hémorragique liposoluble. En 1935, après plusieurs expériences sur des poulets nourris avec des régimes appauvris ou enrichis en lipides, ou en vitamines liposolubles, Dam a été en mesure de décrire plus précisément ce composé liposoluble ayant un lien avec la coagulation. Grâce à ces expériences, il exclut le rôle des vitamines A, D et E. Il nomma alors ce facteur antihémorragique : la vitamine K, avec K pour Koagulation en danois. Dans le même temps, Schönheyder constatait l'absence de prothrombine dans le sang des animaux déficients, Almquist parvint à soigner ceux-ci en leur administrant des extraits de luzerne. En 1936, Dam réussit à extraire la vitamine K1 de la luzerne et trois ans plus tard, en 1939, Edward Adelbert Doisy, un chercheur américain, réalisa sa synthèse chimique. En 1939 également, la vitamine K2 fut extraite à partir de chair de poisson avariée. En 1943, pour la découverte de la vitamine K ainsi que la découverte de sa structure chimique, Carl Peter Henrik Dam et Edward Adelbert Doisy reçurent conjointement le prix Nobel de Médecine.



## B. Les différentes vitamines K

Le nom « vitamine K » regroupe en fait plusieurs composés appartenant à la famille des quinones. Toutes ces molécules ont en commun un noyau 2-méthyl-1,4 naphthoquinone (figure 16), nécessaire au transfert d'électrons (50). Mais ces molécules diffèrent entre elles de par leur chaîne latérale carbonée, plus ou moins saturée en position 3.

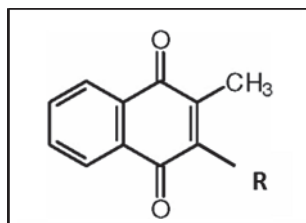


Figure 16 : Noyau 2-méthyl-1,4 naphthoquinone

Nous pouvons distinguer trois types de vitamine K : la phylloquinone (vitamine K1), les ménaquinones (vitamine K2) et la ménadione (vitamine K3).

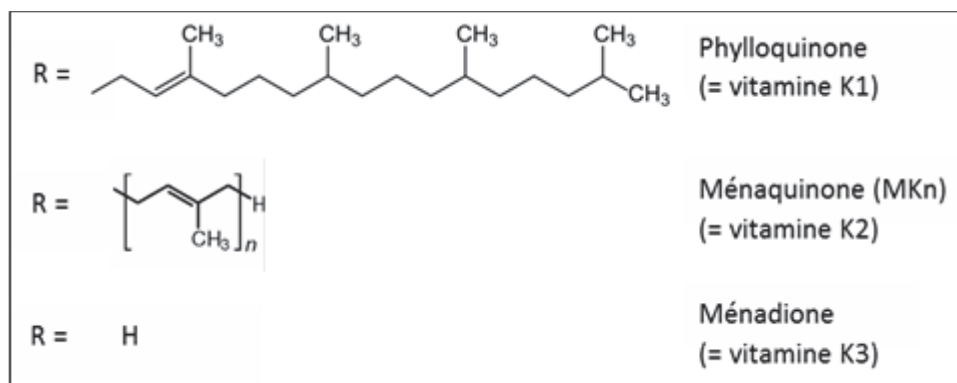


Figure 17 : Représentation des 3 types de vitamine K ( R comme chaîne latérale)

### 1. La vitamine K1

La chaîne latérale de la phylloquinone est une chaîne phytyle. La K1 est majoritairement retrouvée dans les légumes verts (51), tels que dans les brocolis et les épinards et également dans certaines huiles comme l'huile de colza ou de soja. Sa biosynthèse dans les plantes est peu connue. Les premiers travaux ont été réalisés sur des plants d'épinards. Il semble que la Phylloquinone soit majoritairement retrouvée dans la membrane des chloroplastes. La vitamine K1 est directement impliquée dans l'activation des facteurs de coagulation II, VII, IX et X, et elle sera stockée dans le foie. Cependant, elle peut aussi être convertie en vitamine K2. La vitamine K1 est utilisée comme médicament en médecine humaine.

## 2. La vitamine K2

Le nom « vitamine K2 » regroupe un grand nombre de molécules nommées MK(n). La chaîne latérale des vitamines K2 est composée d'un nombre variable d'unités isoprénoïdes allant de n=4 à 13. Ainsi, chez les animaux, la chaîne latérale se compose majoritairement de 4 ou 6 unités isoprénoïdes. Les vitamines K2 sont essentiellement retrouvées dans les aliments fermentés, donc provenant de bactéries ou de levures, tel que le fromage (52). De plus, la microflore intestinale est capable de synthétiser les ménaquinones (52), notamment les MK7 et MK8. Cependant l'apport par ces bactéries est faible. Enfin, la MK4 peut être synthétisée à partir de la phylloquinone. Les ménaquinones s'accumulent préférentiellement dans les tissus extra-hépatiques (53). Beulens a observé une accumulation de ménaquinones et une utilisation plus importante de ces ménaquinones dans les tissus extra-hépatiques, par rapport à la vitamine K1 (54).

## 3. La vitamine K3

La ménadione ne présente pas de chaîne carbonée latérale. Cette vitamine est une forme uniquement synthétique. Étant dépourvue de chaîne latérale, elle est la moins hydrophobe des vitamines K. À cause des effets secondaires néfastes, de nombreux médicaments contenant de la K3 ont été retirés du marché. En revanche, les aliments pour animaux sont souvent supplémentés en K3. Celle-ci sera ensuite transformée en K2 dans l'organisme par addition d'une chaîne latérale. Elle possède une activité biologique 2 à 3 fois supérieure à la K1 et K2, ainsi 1 mg de K3 équivaut à 3,8 mg de K1 (55).

## C. Propriétés physico chimiques et Métabolisme

### 1. Stabilité

La vitamine K est liposoluble. Elle est stable à la chaleur. Cependant, elle sera rapidement dégradée en présence de lumière, d'agents alcalins ou acides et en cas d'irradiation.

## 2. Absorption

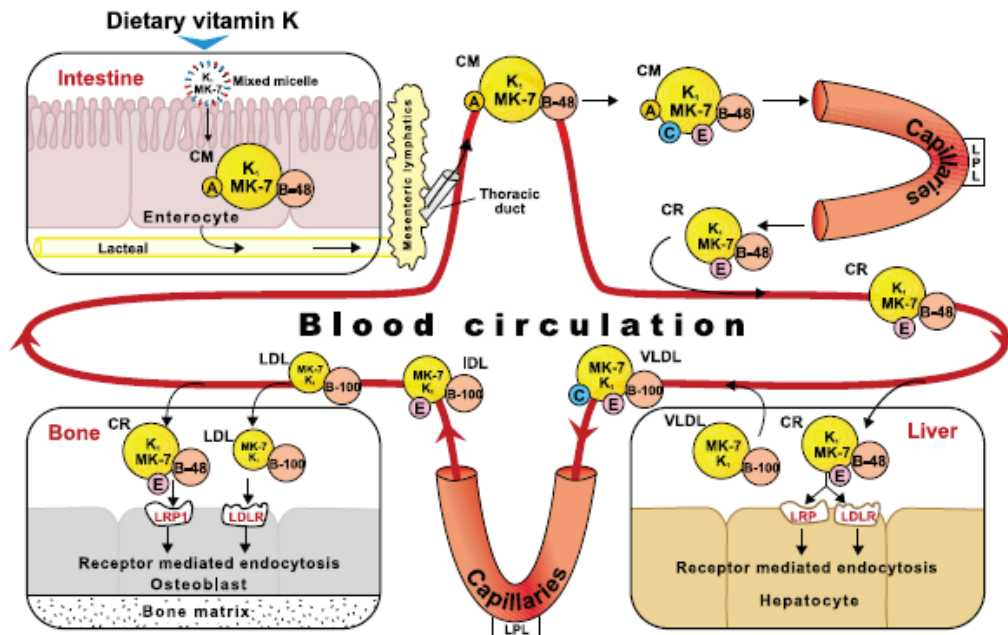


Figure 18: Absorption intestinale et transport de la vitamine K jusqu'au foie par Shearer (52)

Les différents types de vitamine K ne sont pas absorbés de la même façon en fonction de leur lipophilie (56). Un bol alimentaire riche en lipides facilite l'absorption de la vitamine K. Ainsi la phylloquinone synthétique (K1 en médicament), est mélangée dans un excipient huileux et est absorbée à plus de 80%. En revanche, la K1 contenue dans les légumes verts n'est absorbée qu'entre 5% et 15%. Cette mauvaise absorption peut être expliquée par la localisation de la K1 dans les plantes. Elle est située dans les chloroplastes, en association étroite avec la membrane des thylakoïdes, la rendant moins disponible. Les ménaquinones alimentaires sont bien absorbées, alors que les ménaquinones produites par la flore intestinale sont très peu absorbées. L'absorption de la vitamine K se fait principalement au niveau de l'intestin proximal, après solubilisation dans des micelles composées de sels biliaires et de produits issus de la lipolyse pancréatique (57) (figure 18). La biodisponibilité de la ménaquinone provenant de la microflore intestinale est faible car ces ménaquinones sont essentiellement présentes dans le colon distal. Cependant, il y a peu de sels biliaires nécessaires à la solubilisation des ménaquinones dans le colon, de ce fait les ménaquinones sont excrétées sans avoir été absorbées. De nombreux animaux, comme les lapins et certains rongeurs, sont coprophages, en mangeant leurs excréments, cela leur permet de récupérer les ménaquinones issues de leur flore intestinale.

Les micelles, contenant la vitamine K, sont ensuite présentées au niveau de la membrane apicale des entérocytes, ou les différents lipides seront absorbés par l'intermédiaire de transporteurs protéiques. Une hypothèse fut proposée récemment par Takada (58), concernant le transporteur intestinal de la vitamine K1. Selon son étude, une protéine de transport du cholestérol nommée NPC1L1, pour Nienmann Pick C1-like 1, permettrait l'absorption de la vitamine K1. L'absorption de la vitamine K2 n'est toujours pas, à ce jour, expliquée concrètement. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que les vitamines K2, de par leur homologie de structure avec la K1, pourraient peut-être passer dans les entérocytes via NPC1L1. Ceci reste une hypothèse à ce jour, cependant, NPC1L1 marque un pas essentiel dans la compréhension de l'absorption de la vitamine K.

### 3. Transport de la vitamine K

Une fois dans les entérocytes, la vitamine K est incorporée dans des chylomicrons. Les chylomicrons sont ensuite assemblés avec des apoprotéines : apo A et apo B-48. Ils sont alors sécrétés, au pôle basal des entérocytes, dans les vaisseaux chylifères de l'intestin, puis ils rejoignent la circulation sanguine par le canal thoracique. Une fois dans le sang, les chylomicrons acquièrent les apoprotéines C et E et subissent l'action des LPL : lipoprotéines lipases plasmatiques qui libèrent alors les triglycérides. La lipolyse conduit à la formation des LDL. Les LDL vont ensuite se fixer sur les hépatocytes par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques reconnaissant les apoprotéines B et E. Suite à leur liaison, il y a alors endocytose des LDL dans les hépatocytes. Les LDL sont par conséquent délivrées aux lysosomes. Les apoprotéines sont alors dégradées en acides aminés et la vitamine K est libérée dans le foie. Les récepteurs LDL sont majoritairement présents au niveau du foie, mais aussi sur quasiment toutes les cellules de l'organisme, tels que sur les ostéoblastes.

### 4. Stockage et métabolisation

La vitamine K est majoritairement stockée dans le foie, principalement sous la forme MK4, à 90% et un peu sous forme de K1 : environ 10% (52). En effet, les MK4 peuvent provenir directement de la métabolisation de la K1 par l'action de l'enzyme UBIAD1. Cette enzyme clive la chaîne phytyl de la phylloquinone pour former une ménadione qui est ensuite prénylée par UBIAD1 afin de former la MK4 (59). De plus, de faibles quantités de K1 et de

fortes quantités de MK4 sont également retrouvées dans des tissus extra-hépatiques comme le cerveau, la pancréas et les poumons (60).

## 5. Excrétion

La vitamine K est excrétée dans l'urine et la bile. D'après des expériences effectuées avec des traceurs par Shearer et son équipe (57), pour une dose de phylloquinone injectée, 20% est excrétée via l'urine et 40% à 50% par les fèces via la bile. Donc 60% à 70% de la quantité de phylloquinone absorbée durant un repas est perdue lors de l'excrétion. La phylloquinone et les ménaquinones sont métabolisées par le cytochrome CYP4F2 (61). Deux métabolites sont formés dans le foie après raccourcissement de la chaîne carbonée pour les rendre moins hydrophobes : l'acide K1 et l'acide K2. D'ailleurs, chez l'homme, la mutation V443M sur le gène codant pour le CYP4F2, entraîne une diminution de l'activité de ce cytochrome (62). Cela a pour conséquence une augmentation du stock de vitamine K disponible pour la  $\gamma$ -carboxylation des protéines vitamines K dépendantes.

Ces résultats suggèrent que les réserves de l'organisme en vitamine K sont constamment renouvelées.

## D. Fonctions

La vitamine K exerce d'une part des fonctions directes sur l'organisme et d'autre part, des fonctions indirectes par l'intermédiaire de son rôle indispensable dans l'activité de gamma carboxylation sur les protéines vitamine K dépendantes (PVKD). Le rôle précis des PVKD sera décrit en détail par la suite.

### 1. Direct

La vitamine K (K1 et MK(n)) possède des effets spécifiques sur l'organisme, outre son rôle dans la gamma carboxylation. Plusieurs études tendent à montrer un lien entre vitamine K et réponse anti-inflammatoire. Récemment, Mizushina (63) s'est intéressé à des composés intermédiaires entre la vitamine K3 et la MK-4, à savoir la MK-2. Il a montré que la MK-2 diminue l'activation de NF-Kb et la production de TNF $\alpha$ , responsables de la réponse inflammatoire. De plus, la vitamine K jouerait également un rôle de prévention des dommages oxydatifs. En effet, Li *et al* en 2003 (64) ont démontré que la mort cellulaire provoquée par le

stress oxydatif peut être empêchée par de faibles concentrations de K1 et de K2 dans les neurones et les oligodendrocytes en culture. De plus, des études par Mukai (65) ont montré que la vitamine K2 possède une plus grande capacité que l'ubihydroquinone-10 à régénérer l'otocophérol, résultant de la principale voie physiologique de piégeage des radicaux libres. Cela tend donc à démontrer le rôle de la vitamine K comme antioxydant. De plus, la vitamine K est impliquée dans la synthèse de sphingolipides (66), ainsi que dans l'activité exocrine du pancréas (67). Enfin, la MK-4 a été identifiée dans les années 1990 comme une vitamine ayant un rôle capital dans le bon fonctionnement de l'os. En effet, en inhibant la synthèse de prostaglandine E2, qui sont des agents de la résorption osseuse synthétisés par les ostéoblastes, la vitamine K2 protège l'os (68).

La vitamine K est utilisée aujourd'hui aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. Elle est principalement utilisée comme antidote en cas d'empoisonnement aux rodenticides chez l'homme ou les animaux domestiques et en cas d'intoxication iatrogènes aux AVKs. Son utilisation débuta lorsque sa forme pure fut disponible. Les patients présentant comme symptômes un ictère et des problèmes biliaires associés à des hémorragies étaient traités avec de la vitamine K. Depuis 1961, le comité de nutrition de l'American Academy of Pediatric recommande le traitement prophylactique des nouveaux nés avec de la vitamine K, afin de prévenir la maladie hémorragique du nouveau-né (MHNN). Cette maladie se présente sous forme de saignements imprévus, souvent accompagnés d'ecchymoses et d'hémorragies gastro-intestinales et intracrâniennes. Grâce à l'administration de vitamine K, la MHNN classique s'observe rarement maintenant.

Enfin, la vitamine K1 peut également être prescrite dans un but de protection du système cardiovasculaire en cas de formation d'athérosclérose. En effet, la vitamine K1 ralentit la progression de la calcification (69) et diminue la perte d'élasticité artérielle (70).

## 2. Indirect

En 1974, à la suite de recherches sur le rôle de la vitamine K, le professeur Stenflo, ainsi que l'équipe de Nelsestuen, ont simultanément décrit un acide aminé  $\gamma$ -carboxyglutamate (Glu) inhabituel au niveau du facteur II (prothrombine). Ce « Gla » provient d'une carboxylation post traductionnelle des résidus glutamates « Glu ». Cette réaction de  $\gamma$ -carboxylation est réalisée grâce à l'action d'une enzyme nommée GGcX pour Gamma Glutamyl Carboxylase. Cependant, cette réaction nécessite un cofacteur qui est la vitamine K hydroquinone. Cette réaction de  $\gamma$ -carboxylation a lieu dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes, mais

également dans d'autres cellules, notamment les cellules musculaires lisses et les ostéoblastes. Les protéines nécessitant cette  $\gamma$ -carboxylation afin de devenir fonctionnelles sont des PVKD. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine riche en acide glutamique dans leur structure. La structure di-carboxylique des résidus « Gla » permet de créer des liaisons salines très intenses avec des cations divalents et en particulier avec le calcium ionisé. Donc, la présence de résidus « Gla » est indispensable aux PVKD afin de pouvoir lier des ions calciums.

Les fonctions de la vitamine K découlent à fortiori des fonctions des PVKD qu'elle rend fonctionnelles.

### E. Les PVKD

Les protéines vitamine K dépendantes sont des protéines ayant besoin de la vitamine K afin d'accomplir leur rôle physiologique. Ainsi nous pouvons distinguer d'une part l'enzyme GGCX qui a besoin de la vitamine K comme cofacteur pour réaliser la  $\gamma$ -carboxylation et d'autre part les enzymes  $\gamma$ -carboxylées qui sont impliquées dans la coagulation, le métabolisme du calcium et d'autres processus physiologiques. Les PVKD sont des protéines avec des acides glutamiques qui doivent être  $\gamma$ -carboxylés en glutamate afin que ces protéines soient fonctionnelles. Cette réaction post traductionnelle nécessite la GGCX ainsi que la vitamine K, mais également du  $\text{CO}_2$  et de l' $\text{O}_2$  (figure 19).

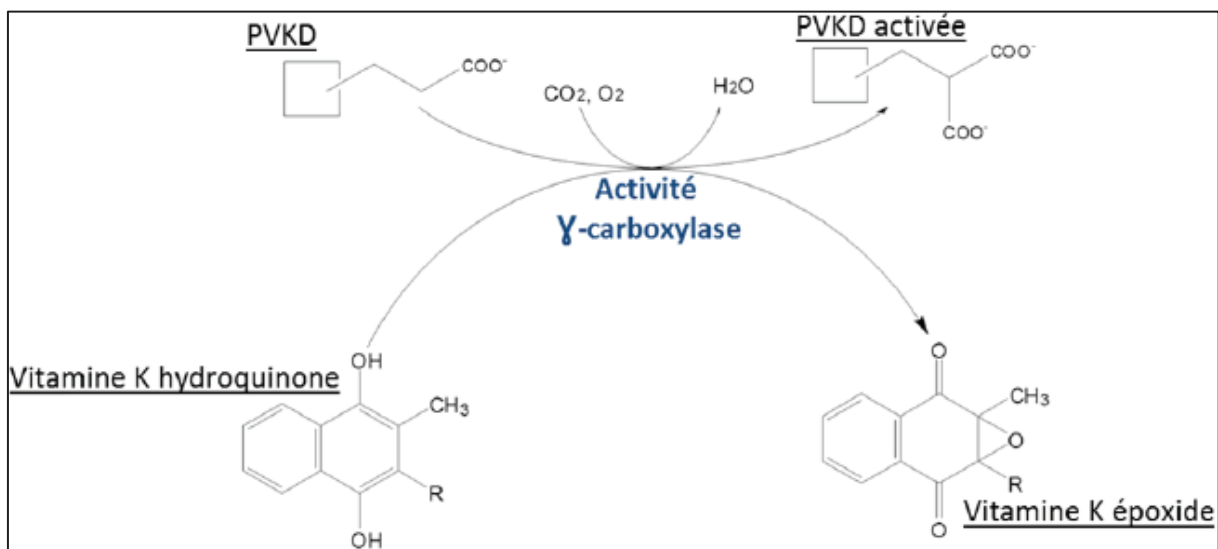


Figure 19 : Étape de gamma-carboxylation par GGCX

## 1. GGCX

GGCX a été découverte en 1975 (71) et purifiée pour la première fois en 1991 à partir de foie de bovin (72). La même année, les ADNc codant pour la GGCX bovine et humaine furent isolés. Le gène codant pour la GGCX fait 13Kb et comporte 15 exons. GGCX est une protéine membranaire de 758 acides aminés avec 5 segments transmembranaires. Elle est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (90% dans le réticulum endoplasmique rugueux et 10% dans le lisse). L'extrémité N terminale de cette protéine est localisée dans le cytoplasme et l'extrémité C terminale dans la lumière du réticulum endoplasmique (figure 20).

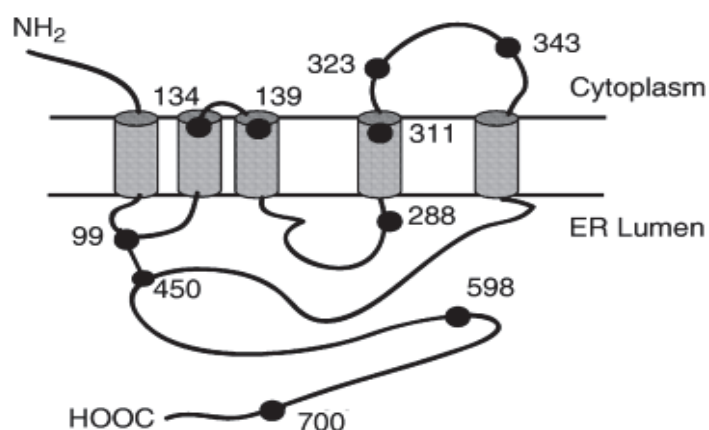


Figure 20 : Topologie de l'enzyme GGCX par stafford en 2005 (51)

### a) Mode d'action

La  $\gamma$ -carboxylation consiste en la substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxylé  $\text{COO}^-$  sur le carbone  $\gamma$  d'un acide glutamique « Glu », le transformant ainsi en acide  $\gamma$ -carboxyglutamique « Gla ». Ainsi GGCX catalyse deux réactions chimiques couplées au niveau de son site actif, à savoir l'addition de  $\text{CO}_2$  pour former un « Gla » d'un côté, et de l'autre côté, l'oxydation de la vitamine K hydroquinone en vitamine 2,3 époxyde, en présence d' $\text{O}_2$ .

GGCX se lie spécifiquement aux PVKD car elles possèdent un propeptide spécifique de 18 acides aminés en amont des domaines « Gla » (73). Ce propeptide fut découvert en 1985 par Pan et Price (74). Il se fixe sur la GGCX au niveau d'un site d'interaction différent du site actif de GGCX. Il a été montré que des mutations dans la séquence du propeptide diminuent



fortement la  $\gamma$ -carboxylation de la protéine (75). Une fois la PVKD  $\gamma$ -carboxylée, le propeptide est éliminé par protéolyse dans l'appareil de Golgi.

b) Mécanisme catalytique de GGCX

Fury et son équipe ont proposé en 1999 un mécanisme de carboxylation, où la vitamine KH2 est considérée comme une base faible (76). Son postulat concernant l'implication d'une cystéine dans le site actif de GGCX (77) pour amorcer la réaction a été modifié par Rishavy en 2006 qui met en évidence la lysine comme étant l'élément déclencheur de la réaction (78). Ainsi, la réaction de  $\gamma$ -carboxylation commence avec la lysine 218, présente dans le site actif de GGCX, déprotone la vitamine KH2 en présence d' $O_2$  permettant d'obtenir une base forte, hautement réactive. Cette base forte va alors déprotone le résidu glutamyl afin d'aboutir à la formation d'un carbanion qui réagit avec le  $CO_2$  pour former un résidu glutamyl  $\gamma$ -carboxylé : un « Gla », tandis que la vitamine K est protonée pour former la vitamine 2,3 époxyde (figure 21).

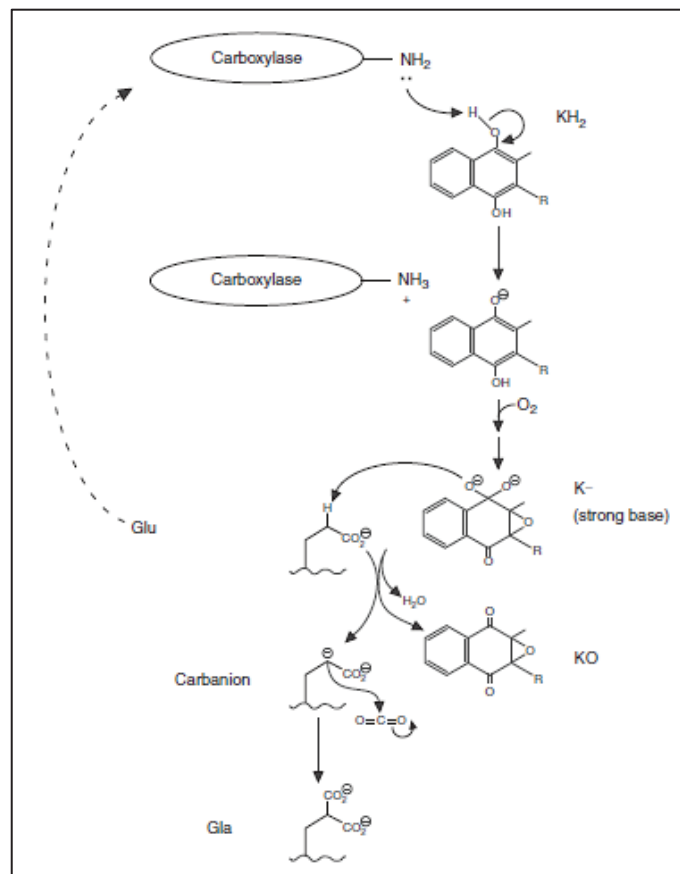


Figure 21 : Reaction de  $\gamma$ -carboxylation selon Berkner (73)

Durant la  $\gamma$ -carboxylation, le propeptide reste lié sur la GGCX, contrairement au domaine « Gla » nouvellement formé, ce qui entraîne le positionnement du prochain résidu « Gla » afin d'être  $\gamma$ -carboxylé. Lorsque tous les résidus « Glu » du domaine « Gla » de la PVKD sont  $\gamma$ -carboxylés, l'affinité du propeptide pour la GGCX est réduite, libérant ainsi la protéine modifiée.

En raison de l'activation allostérique initiée par la liaison entre la GGCX et la PVKD, le rapprochement des résidus « Glu » non modifiés vers le centre actif de l'enzyme est augmenté (79). La liaison enzyme-substrat provoque un deuxième changement de conformation allostérique, conduisant à une affinité accrue de la GGCX pour la vitamine KH<sub>2</sub> (80).

## 2. Les différentes PVKD

La vitamine K hydroquinone est indispensable à la GGCX pour réaliser la  $\gamma$ -carboxylation. Sans cette vitamine K, les résidus « Glu » ne sont pas modifiés en « Gla », ce qui rend les PVKD non fonctionnelles. En effet, les résidus « Gla » confèrent des charges négatives permettant aux PVKD de lier le Ca<sup>2+</sup> avec une haute affinité. Cette liaison aux ions Ca<sup>2+</sup> joue un rôle central dans la liaison des PVKD aux lipides membranaires et dans l'accomplissement de leurs fonctions physiologiques.

Actuellement, les PVKD connues sont au nombre de 16 et peuvent être réparties en deux catégories : les PVKD hépatiques et les PVKD extra-hépatiques.

Pendant de nombreuses années, on a attribué aux PVKD un rôle physiologique concentré exclusivement dans la coagulation. Cependant, l'identification de 9 autres protéines contenant des résidus carboxyglutamates a permis d'orienter les recherches vers de nouvelles fonctions de la vitamine K, toutes liées à la capacité de ces PVKD à lier le calcium via leur domaine « Gla ».

Dans un premier temps, les PVKD hépatiques, à savoir les facteurs intervenant dans la coagulation, seront rappelés brièvement, puis dans un second temps, les PVKD extra-hépatiques seront détaillées plus précisément.

### a) PVKD hépatiques

Sur les 16 PVKD, 7 d'entre elles sont synthétisées dans le foie et possèdent un rôle dans l'hémostase. Comme rappelé dans la partie sur la coagulation, les facteurs II, VII, IX et X

sont essentiels pour former le caillot. Ces 4 facteurs possèdent 10 ou 12 résidus « Glu » à leur extrémité N terminale, ils ont besoin d'être  $\gamma$ -carboxylés afin de pouvoir fixer le calcium et interagir avec les phospholipides membranaires. Dam a d'ailleurs observé qu'une carence en vitamine K entraîne des hémorragies.

Egalement, via la  $\gamma$ -carboxylation, la vitamine K est impliquée dans l'activation de la protéine C, de la protéine S et de la protéine Z. Ces 3 protéines ont des propriétés inhibitrices de la coagulation.

### **La protéine C (PC):**

La PC activée est une serine protéase, synthétisée par le foie, jouant un rôle central dans la coagulation. En effet, une fois activée par la thrombine liée à la thrombomoduline, la PC inactive les facteurs Va et VIIIa, en présence de la protéine S. De plus, la PC exerce un effet pro-fibrinolytique en inactivant la PAI1 (81). Des études récentes montrent un lien entre la protéine C et la prolifération des cellules endothéliales (82). En effet, la PC activée se fixe sur les cellules endothéliales via le récepteur EPCR (endothelial protein C receptor). En se fixant sur EPCR, la PC active une protéase : la PAR-1 qui par phosphorylation va à son tour activer la voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) (83). Etant donné que la voie des MAPK est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération cellulaire, la protéine C activée semble ainsi induire la prolifération des cellules endothéliales et provoquer l'angiogenèse (82).

### **La protéine S (PS):**

La PS est retrouvée dans le foie, mais également dans le cerveau, le cœur, les ovaires, la rate etc... La PS est un cofacteur de la protéine C, permettant d'optimiser l'action anticoagulante de la protéine C. De plus, Rosing en 2008, a montré que la PS va servir de cofacteur au TFPI permettant de stimuler l'inhibition du facteur tissulaire (84). D'ailleurs, pour des personnes ayant un déficit en protéine S, il y a une augmentation du risque de développer des thrombi veineux. La PS circule dans le sang soit à l'état libre (40%), soit liée à une protéine. Une fois complexée à la C4BP, la PS va limiter l'activation du complément et va également éliminer les cellules apoptiques par phagocytose. Sans régulation, le complément peut provoquer une réponse inflammatoire indésirable au niveau des tissus infectés. Durant l'apoptose, la phosphatidylsérine est exposée vers l'extérieur de la membrane cellulaire de telle sorte que le complexe protéine S- C4BP s'y fixe via les résidus « Gla » de la protéine S. Le C4BP peut

alors intervenir sur la dernière étape de l'activation du complément et assurer sa fonction de cofacteur de la dégradation de la protéine C4b. Ainsi, en se liant à la protéine C4BP, la protéine S assure un rôle important pour éviter une réponse inflammatoire indésirable (85).

### **La protéine Z (PZ) :**

La PZ est la dernière protéine hépatique décrite dans la littérature. Elle a été initialement identifiée par Prowse et Esnouf dans du plasma bovin en 1977 et isolée en 1994 (86). C'est une glycoprotéine de 62 Kda possédant 13 résidus « Gla ». La PZ présente la particularité de ne pas avoir d'activité enzymatique. En revanche, elle sert de cofacteur à une protéase : la ZPI pour protein Z dependant protease inhibitor. La ZPI inhibe le facteur Xa et est 1000 fois plus efficace une fois complexée avec la protéine Z. En 2007, Sofi *et al* ont observé une association entre de faibles taux de PZ et une augmentation du risque de thrombose artérielle (87). Ainsi, cela met en évidence un lien entre la PZ et l'athérosclérose. Butschkau en 2014 a montré dans une étude que chez des souris PZ<sup>-/-</sup>, après une lésion artérielle, l'intima était plus épaisse que chez des souris PZ<sup>+/+</sup> (88). Egalement, chez ces souris PZ<sup>-/-</sup>, il y a une réponse inflammatoire accrue par la libération excessive de cytokines et l'infiltration de cellules inflammatoires dans le tissu. Cela renforce le rôle de la PZ dans la prévention des maladies athérosclérotiques.

Enfin, Butschkau propose un lien entre la PZ et l'angiogenèse. En effet, la PZ favoriserait l'angiogenèse en stimulant l'expression du récepteur CXCR sur les cellules endothéliales et par l'intermédiaire de la protéine G (48). Cependant concernant son rôle sur l'angiogenèse, le mode d'action de la PZ sur les mécanismes moléculaires sous-jacents reste à clarifier.

#### **b) PVKD Extra Hépatiques**

##### **b)1) La famille des protéines Gla transmembranaires**

Cette famille de protéines regroupe 4 PVKD dont les fonctions restent encore inconnues à ce jour. Ces protéines peuvent être réparties en 2 groupes : la PRG1 et la PRG2 qui sont des protéines riches en proline 1 et 2 (89), et les protéines TMG3 et TMG4 qui sont des protéines « Gla » membranaires (90). Ce sont toutes des protéines transmembranaires. Leur ADNc prédit que ce sont des protéines de la membrane plasmique, alors que les autres PVKD sont plutôt des protéines circulant dans l'espace extracellulaire. Ces protéines « Gla

transmembranaires » sont donc liées à la membrane via un segment transmembranaire tandis que les autres PVKD utilisent leur domaine « Gla » pour se lier à la membrane cellulaire. En ce qui concerne les TMG, le domaine « Gla » aura une autre fonction. Berkner et Runge proposent en 2004 une hypothèse selon laquelle les cellules exprimant les TMG pourraient interagir via leur domaine « Gla » avec d'autres cellules exprimant la phosphatidylserine à leur surface (85).

### b)2) Protéines avec de nombreux Glu gamma carboxylables dans leur séquence

Ces protéines sont au nombre de 2 : la GRP (Gla-Rich-Protein) et la Périostine 1. Ces deux PVKD possèdent 16 résidus « Gla » potentiellement  $\gamma$ -carboxylés et sont présentes dans la plupart des tissus.

La GRP est une protéine circulante de 74 acides aminés, qui est exprimée et accumulée dans les tissus mous mais se retrouve principalement dans l'os et le cartilage. D'ailleurs, il a été clairement montré que la GRP était largement associée au dépôt calcique, de façon similaire à la MGP (91). En revanche, aucune information n'établit clairement l'état de  $\gamma$ -carboxylation ainsi que sa fonction précise.

La périostine 1 se retrouve majoritairement dans les tissus conjonctifs riches en collagène. De plus, elle est exprimée au cours de l'ontogénèse, elle est présente dans les tissus conjonctifs soumis à des contraintes mécaniques, y compris l'os, plus précisément le périoste, les ligaments parodontaux, les tendons, les valvules cardiaques ou la peau (92). Elle est produite dans les cellules mésenchymateuses stromales de la moelle osseuse, qui sont des cellules souches capables de se différencier en ostéoblastes, en chondrocytes ou en adipocytes (93). La périostine 1 est associée à la matrice extracellulaire où elle jouerait potentiellement un rôle dans la minéralisation. Récemment, plusieurs études ont suggéré que la périostine 1 peut jouer un rôle dans la régulation de la formation osseuse ainsi que dans le développement cardiaque (94). Selon les tissus et l'état de différenciation cellulaire, la périostine 1 serait plus ou moins  $\gamma$ -carboxylée. Ainsi, dans les cellules mésenchymateuses stromales et les adipocytes, elle serait  $\gamma$ -carboxylée, en revanche dans les ostéoblastes, elle serait non  $\gamma$ -carboxylée.

### b)3) GAS 6

GAS 6 ( Growth Arrest Specific gene 6) a été découverte en 1988 (95) et caractérisée en 1993 (96). C'est une glycoprotéine de 676 acides aminés possédant 44% d'homologie avec la séquence de la protéine S. Les domaines structuraux de ces 2 protéines diffèrent de part le fait que GAS 6 qui ne possède pas un site de clivage par sérine-protéases contrairement à la protéine S. GAS 6 va interagir avec des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase : les récepteurs TAM qui comprennent les récepteurs Tyro3, AXL et Mer. GAS 6 montre une plus grande affinité pour les récepteurs AXL (97). GAS 6 interagit avec les récepteurs TAM par l'intermédiaire de son domaine SMBG. GAS 6 et la protéine S sont les deux ligands connus de la famille des récepteurs TAM.

La protéine GAS 6 va jouer un rôle dans une pléiade de processus physiologiques, telles que la survie et la prolifération de divers types cellulaires, par exemple pour les cellules vasculaires du muscle lisse (98) et les fibroblastes cardiaques (99), mais également la migration cellulaire (100). Récemment, l'expression de GAS 6 a été mise en relation avec la régulation de la différenciation chondrocytaire (101) et elle serait aussi en lien avec une tolérance altérée au glucose (102). De plus, GAS 6 régulerait négativement l'inflammation dans les cellules dendritiques et les macrophages, et favoriserait la phagocytose des cellules apoptiques (103). Enfin, quelques études se focalisent sur le rôle de GAS 6, couplé à son récepteur AXL, sur le développement de l'obésité. En effet, Wu dans sa publication de 2015 a recensé plusieurs études cliniques mettant en lien GAS 6 avec le développement de l'obésité. L'ensemble de ces observations le conduit à établir que GAS 6 participe à l'adipogénèse en agissant via les récepteur TAM sur la régulation et la prolifération cellulaire (104). D'ailleurs, Augustine *et al* ont démontré que des souris sur-exprimant les récepteurs AXL avaient une augmentation de poids corporel menant au développement de l'obésité (105).

### b)4) MGP

La MGP (Matrix Gla Protein) fut décrite pour la première fois en 1983 par Price *et al* à partir de la purification de la matrice d'os de bovin (106). C'est une PVKD composée de 84 acides aminés, avec 9 résidus glutamiques dont 5 potentiellement  $\gamma$ -carboxylés. La MGP est retrouvée au sein du cartilage, des poumons, du cœur et des reins (107), mais également dans les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. C'est au sein de ces cellules que

l'activité des MGP s'observe le plus. Sa transcription est stimulée par la vitamine D3 et inhibée par l'acide rétinoïque (108). La MGP joue un rôle essentiel dans la prévention de la calcification tissulaire. En effet, la fonction de cette PVKD a été clairement identifiée lorsque son expression fut éteinte chez des souris MGP<sup>-/-</sup>. Ces souris MGP<sup>-/-</sup> étaient normales à leur naissance, mais elles ont rapidement développé des calcifications cartilagineuses et artérielles qui ont provoqué leur mort après 8 semaines (109). Cependant, seule la forme  $\gamma$ -carboxylée de la MGP rend cette protéine fonctionnelle. En effet, la  $\gamma$ -carboxylation permet à la MGP de fixer les ions Ca<sup>2+</sup> et ainsi de pouvoir se lier à des protéines morphogéniques osseuses appelées : BMP-2 (Bone Morphogenic Protein 2) (110). La BMP-2 est un facteur de croissance induisant la production de cartilage et d'os à partir de cellules du mésenchyme. En se liant à BMP-2, les MGP empêchent la BMP-2 de se fixer sur son récepteur et donc empêchent son action (111). Ainsi, par cette action, la MGP  $\gamma$ -carboxylée régule l'ostéogénèse et agit comme principal inhibiteur de la calcification vasculaire. De plus, la MGP peut également se lier à la vitronectine via sa région N-terminale. La vitronectine est une glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire des artères (112). Cette liaison permet d'aider la formation de vésicules matricielles et de corps apoptiques impliqués lors de l'apoptose des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. Ces particules membranaires permettent alors au processus de phagocytose de se dérouler de manière optimale, car s'il n'est pas bien établi, alors cette phagocytose peut jouer un rôle dans l'initialisation de calcification (113).

### b)5) Ostéocalcine

L'ostéocalcine (OC), également nommée BGP pour Bone Gla Protein, est une PVKD de 49 acides aminés sécrétée spécifiquement par les ostéoblastes. Son domaine « Gla » est composé de 3 acides glutamiques potentiellement  $\gamma$ -carboxylés, et cette OC peut circuler sous forme  $\gamma$ -carboxylée ou non. La  $\gamma$ -carboxylation de l'OC lui confère une forte affinité pour les ions calcium de l'hydroxyapatite de l'os. Son domaine « Gla » n'est pas autant affine aux ions calcium que celui des autres PVKD. Ainsi, alors que les autres PVKD fixent le calcium dans le but de se fixer ensuite aux membranes cellulaires, la  $\gamma$ -carboxylation des 3 « Glu » de l'OC va former une hélice  $\alpha$  où tous les « Gla » seront orientés vers la surface et l'OC fixera le calcium via les cristaux d'hydroxyapatite (85). Ceci explique sa forte présence de la matrice osseuse et suppose un rôle fonctionnel majeur dans l'os. Cependant, des souris OC<sup>-/-</sup> ne présentent aucune anomalie osseuse, ces souris ont même une augmentation de leur masse



osseuse. Chez ces souris  $OC^{-/-}$ , il a été observé une diminution de la taille des îlots de Langerhans, une hypo-insulinémie et une diminution de l'expression et de la concentration plasmatique d'adiponectine (114). En 1996, Ducy et son équipe ont ajouté une ostéocalcine recombinante à une co-culture de fibroblastes et de cellules  $\beta$ , ce qui a eu pour conséquence de stimuler l'expression d'insuline. La forme non  $\gamma$ -carboxylée de l'OC produite par les ostéoblastes ou libérée par l'action des ostéoclastes va être impliquée dans l'homéostasie du glucose (115,116). L'OC stimule la prolifération des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques et la sécrétion d'adiponectine qui permet d'augmenter la sensibilité des tissus adipeux à l'insuline. Ainsi, l'OC non  $\gamma$ -carboxylée est considérée à ce jour comme une hormone osseuse servant à la communication entre l'os et le pancréas, et assurant une régulation du métabolisme énergétique (115) (figure 22).

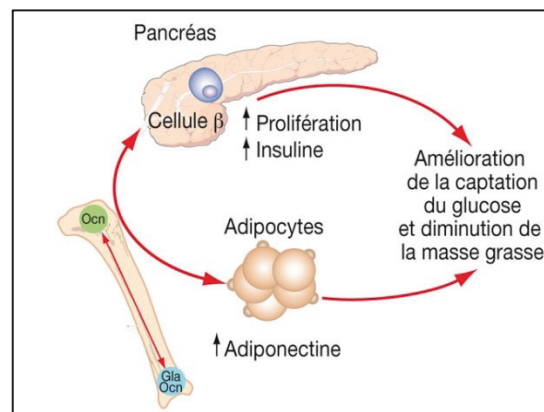


Figure 22 : Rôle de l'ostéocalcine non  $\gamma$ -carboxylée selon Lee *et al* 2007

La  $\gamma$ -carboxylation de l'OC semble être régulée par des tyrosines phosphatases appelées OST-PTT. En effet, lorsque le gène codant pour ces OST-PTT est éteint chez la souris (gène *Esp*), Lee observe une augmentation de la prolifération de cellules  $\beta$  pancréatiques et une augmentation de la sécrétion d'insuline. L'OST-PTT n'agit pas directement sur l'OC mais plutôt sur sa  $\gamma$ -carboxylation par l'intermédiaire des récepteurs à insuline, les récepteurs à insuline étant des tyrosines-kinases, ils sont inhibés par des tyrosines phosphatases (117). L'OST-PTT va donc interférer avec l'action de l'insuline sur les ostéoblastes. En effet, l'insuline va exercer une rétroaction positive sur l'activité de l'OC non  $\gamma$ -carboxylée. Fulzele, dans sa publication de 2010, inhibe chez la souris les récepteurs à insuline, il observe alors de faibles taux circulants d'OC non  $\gamma$ -carboxylée et un déficit d'ostéoblaste. Avec l'âge, ces souris ont développé une hyperglycémie et une surcharge pondérale (118).



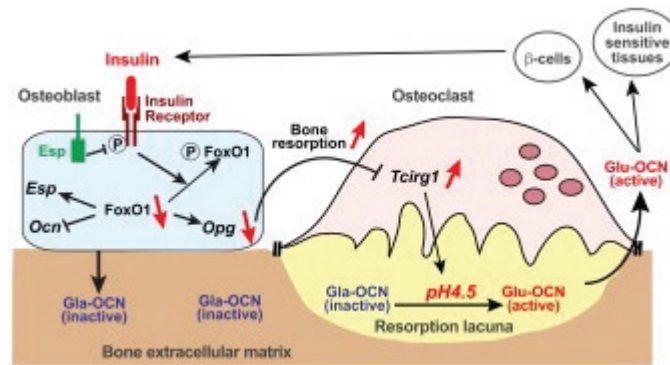


Figure 23 : Rétro-action positive de l'insuline sur la libération d'ostéocalcine non  $\gamma$ -carboxylée selon Ferron *et al* en 2010

FoxO1 est une molécule connue pour stimuler la  $\gamma$ -carboxylation de l'OC dans les ostéoblastes (figure 23). De plus, FoxO1 agit également sur la régulation de l'expression de l'ostéoprotégerine (Opg) (119). Il a été montré par Teitelbaum et Ross en 2003 que l'Opg va se lier avec son ligand RANKL empêchant ainsi RANKL de se fixer sur son récepteur et d'induire l'ostéoclastogénèse (120). Donc l'Opg, par son action, est un régulateur négatif de la fonction ostéoclastique. Or une inhibition de FoxO1 a pour conséquence une diminution de l'expression et de la sécrétion d'Opg dans les ostéoblastes, ce qui permet la différenciation des ostéoblastes en ostéoclastes. Or l'insuline, en transmettant son signal, a la capacité d'inhiber FoxO1. Ainsi, l'insuline se fixe sur les ostéoblastes via son récepteur membranaire et inhibe FoxO1 ce qui diminue l'expression de l'Opg. Ainsi, cela va induire la résorption osseuse par les ostéoclastes qui acidifieront le pH à 4,5. Ce pH permet la décarboxylation de l'OC synthétisée par les ostéoblastes ce qui induit une augmentation de l'OC non  $\gamma$ -carboxylée et permet ses différentes actions (121).

#### **IV. Recyclage de la vitamine K**

L'importance de la vitamine K dans la coagulation est connue depuis le milieu des années 30. Cependant, son mécanisme d'action est resté inconnu jusqu'à la mise en évidence du cycle de la vitamine K, nécessaire à la  $\gamma$ -carboxylation des PVKD.

En effet, un apport adéquat en vitamine K est nécessaire afin de pouvoir réaliser la modification post traductionnelle des « Glu » en « Gla » des facteurs de coagulation, mais également de toutes les autres PVKD extra-hépatiques détaillées précédemment. Des études établissent que les besoins quotidiens en vitamine K sont de l'ordre de 120  $\mu\text{g}/\text{jour}$  pour un homme adulte sain. En effet, la vitamine K a un rôle essentiel de cofacteur pour la GGCX et sera alors oxydée en vitamine K époxyde. Cette vitamine K époxyde n'est pas utilisable par GGCX. Donc le stock de vitamine K hydroquinone est vital et indispensable. Une partie des besoins en vitamine K réduite va être comblée par l'apport alimentaire (56), mais cet apport alimentaire est insuffisant (54). Pourtant, les déficits en vitamine K sont rares chez les adultes sains (56). Cela s'explique par le fait que l'organisme met en place un recyclage de la vitamine K époxyde en vitamine K hydroquinone, afin que celle-ci puisse à nouveau interagir avec la GGCX. Ainsi, une molécule de vitamine K peut assurer environ 500 réactions de carboxylation (122).

Le recyclage de la vitamine K s'effectue en deux étapes :

- Une première réaction conduisant à la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone : l'activité VKOR. L'enzyme catalysant cette réaction est appelée la VKORC1 (vitamin K epoxyde reductase sub-unit 1).
- Une seconde étape permet la réduction de la vitamine K quinone en vitamine K hydroquinone : l'activité VKR. Cette activité VKR est catalysée par une NADPH quinone oxydoréductase, NQO1 est soupçonnée d'être l'enzyme responsable de cette réaction, cependant VKORC1 peut également participer de manière minoritaire à cette réaction.

## A. Activité VKOR

### 1. Vkorc1

#### a) Historique de la découverte du gène

L'activité VKOR a été décrite pour la première fois en 1970 par Bell et Matshiner (123). Cette activité fut très rapidement décrite comme inhibable dans le foie, par une injection de Warfarine. En 2004, deux équipes différentes : Rost *et al* et Li *et al* ont découvert un gène localisé sur le chromosome 16 de l'homme, 1 du rat et le chromosome 7 de la souris : le gène *vkorc1* (124,125). Ce gène de 5126 paires de bases et constitué de 3 exons, code pour une petite protéine de 163 acides aminés. Le Knockdown de ce gène par siRNA a pour conséquence une réduction significative de l'activité VKOR (125). En revanche, une surexpression de *vkorc1* dans des cellules d'insectes entraîne l'apparition d'une activité VKOR inhibable par des AVKs (124).

A cette époque, une maladie génétique humaine très rare entraînant des hémorragies et touchant simultanément l'ensemble des facteurs de coagulation vitamine K dépendants sans pour autant modifier la structure des gènes correspondants, ni la structure du gène *GGCX*, avait été identifiée : la VKCFD2 (Vitamin K dependant Clotting Factors Deficiency 2). L'équipe allemande menée par Rost a alors comparé les régions chromosomiques du locus D1rat 219 (locus *Rw*) avec celles autour du locus où avait été localisée la maladie VKCFD2. Puisque ces deux locus avaient été décrits comme impliqués dans l'activité VKOR, l'équipe allemande formula alors l'hypothèse que leur base génétique était commune. Après séquençage des zones orthologues de ces deux régions génétiques, Rost et son équipe réussirent à repérer le gène responsable et le nommèrent *vkorc1*.

L'analyse systématique des séquences du gène *vkorc1* a permis de mettre en évidence que ce gène appartient à une large famille de gènes homologues retrouvés aussi bien chez les vertébrés que chez les plantes et les bactéries (126).

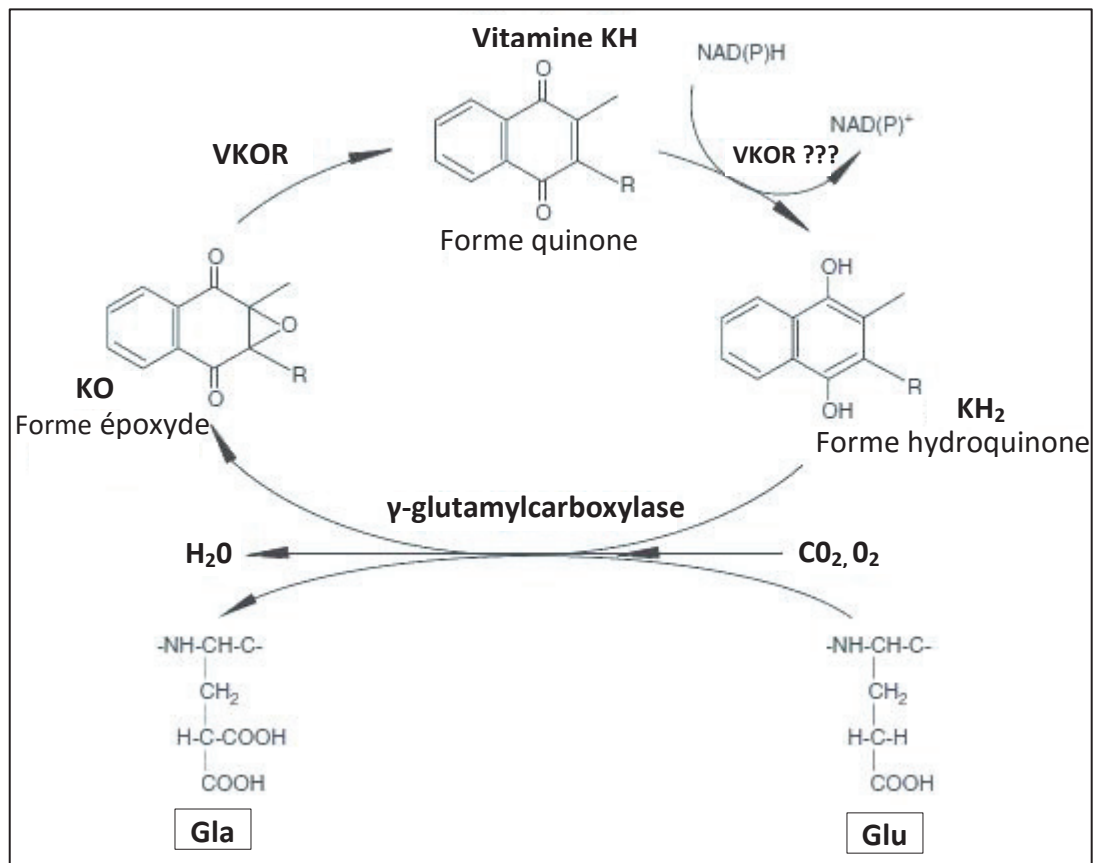


Figure 24 : Cycle du recyclage de la vitamine K (127)

La fonction de *vkorc1* dans l'activité VKOR a été pleinement acceptée en 2009 grâce aux travaux de Spohn et son équipe, qui ont réussi à obtenir de souris *vkorc1<sup>-/-</sup>* (128). Si ces souris naissent normalement, 50% d'entre elles meurent d'hémorragie lors de la première semaine et au bout de trois semaines, l'ensemble des souris est décédé. Cependant, une injection journalière de vitamine K permet de les maintenir en vie avec un phénotype identique à celui de souris sauvages (*vkorc1<sup>+/+</sup>*). En revanche, si l'injection journalière de vitamine K n'est plus réalisée, les souris meurent en une semaine. L'analyse sanguine de ces souris montre d'ailleurs que deux jours après l'arrêt de l'injection de vitamine K, l'activité des facteurs de coagulation devient indétectable. Cela atteste donc bien de la relation qui lie *vkorc1*, l'enzyme VKORC1 et l'activité des facteurs de coagulation par  $\gamma$ -carboxylation. VKORC1 possède donc un rôle central dans le cycle de la vitamine K, au même titre que GGCX (figure 24).

### b) Topologie

VKORC1 est une enzyme localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique rugueux. Dès la découverte du gène *vkorc1*, Stafford proposa une topologie de VKORC1 avec 3 domaines transmembranaires (125). La même année, Goodstadt et Ponting analysèrent

l'homologie de 37 séquences de VKORC1 et ils prédirent que VKORC1 posséderait plutôt 4 domaines transmembranaires. Suite à la cristallisation d'un homologue bactérien à VKORC1 : l'ubiquinone réductase de *Synechococcus* sp (129), il a été mis en évidence que la partie catalytique de l'ubiquinone réductase s'organise selon 4 domaines transmembranaires, ce qui rejoint l'hypothèse de Goodstadt et Ponting.

Grâce à cette structure cristallographique, deux topologies très similaires de VKORC1 humaine furent proposées d'une part par Li *et al* et d'autre part, par Watzka *et al* en 2010. Chacun d'entre eux s'accorde sur le fait que VKORC1 possède une extrémité N-terminale cytoplasmique, ainsi que 4 domaines transmembranaires et une longue boucle terminale reliant les domaines transmembranaires 1 et 2 (figure 25).

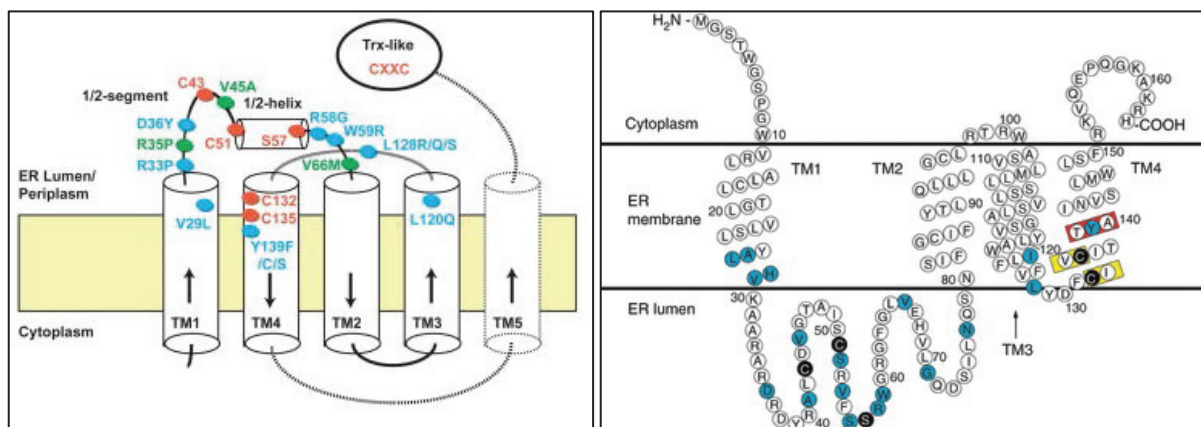


Figure 25 : Topologie de VKORC1 proposé par Li *et al* à gauche (129) et par Watzka *et al* à droite (130)

L'étude des différentes VKORs, réalisée par Goodstadt et Ponting en 2004 a mis en évidence une haute conservation de 4 cystéines : Cys 43, 51, 132 et 135 (131), avec les Cystéines 132 et 135 qui forment le motif CXXC, un motif rencontré dans de nombreuses oxydoréductases. Egalement, un autre acide aminé est fortement conservé entre les espèces : la sérine en position 57. L'importance de ce motif Cys132-XXCys135 a été mise en évidence en 2005 par Rost (132). Jin *et al* en 2007 ont remplacé les 2 cystéines en alanine par mutagenèse dirigée, et cela a conduit à une perte de l'activité VKOR, prouvant ainsi que ces deux cystéines font partie du site actif de VKORC1 (133). L'ensemble des travaux de mutagenèse dirigée sur les acides aminés conservés a permis de suggérer la participation de la Sérine 57 dans la fixation du substrat, l'implication des Cystéines 132 et 135 dans le centre redox CXXC et l'implication des Cystéines 43 et 51 dans le transfert du pouvoir réducteur (134).

### c) Mécanisme catalytique

En 1981, donc 23 ans avant la découverte du gène VKORC1, un mécanisme réactionnel de conversion de l'époxyde de vitamine K en vitamine K quinone fut proposé par Silverman, basé sur des études chimiques (135) (figure 26).

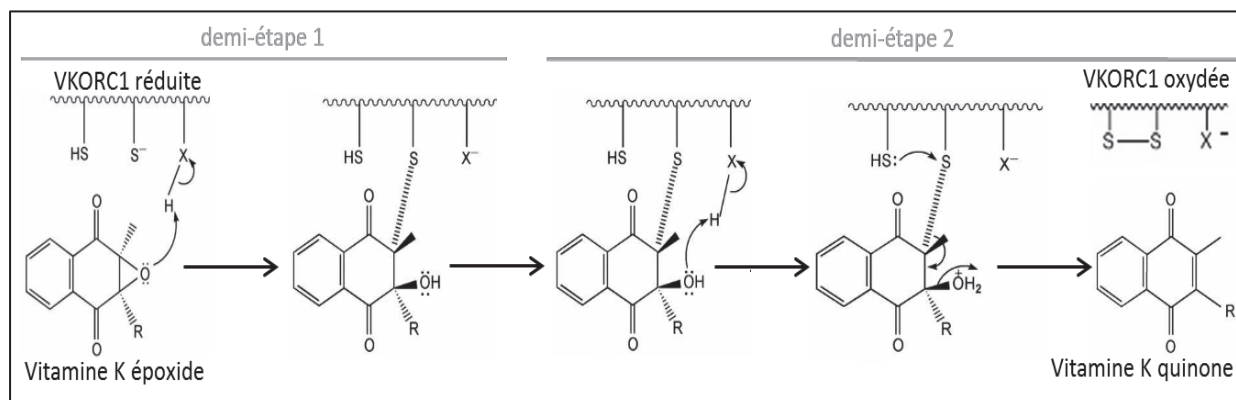


Figure 26 : Mécanisme réactionnel de la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone

(Silverman, 1981)

Ce mécanisme implique un site actif composé de deux cystéines et d'un acide aminé acide qui pourrait jouer le rôle de catalyseur acide-base. Dans la forme oxydée de l'enzyme, ces cystéines se trouvent sous forme de pont disulfure et prennent la forme de groupement thiol dans l'enzyme réduite. L'activation de l'enzyme est réalisée via la réduction de ce pont disulfure, ainsi l'enzyme est réduite. L'enzyme réduite fixe alors l'époxyde de la vitamine K et l'atome d'oxygène de cet époxyde est protonné par l'acide aminé acide de VKORC1 proche du site actif. De façon concomitante, par un mécanisme vraisemblablement concerté, le thiol d'une des 2 cystéines du site actif attaque le carbone 2 de l'époxyde formant un adduit covalent (demi-étape 1). La protonation du groupement hydroxyle conduit ensuite, toujours par un mécanisme sans doute concerté, au départ du groupement OH<sup>-</sup> sous forme de H<sub>2</sub>O avec formation de la forme oxydée de l'enzyme et de la vitamine K quinone (demi-étape 2) (figure 26).

Après la demi-étape 1, VKORC1 doit être protonnée pour pouvoir finir son activité VKOR. Toutefois, aucune explication n'a été décrite dans la littérature jusqu'à 2013 où Matagrín *et al* ont réussi à détailler ce mécanisme catalytique de manière un peu plus poussée, en faisant intervenir la tyrosine en position 139 (qui pour rappel est un acide aminé conservé dans la séquence de VKORC1) comme donneur de proton (figure 27).

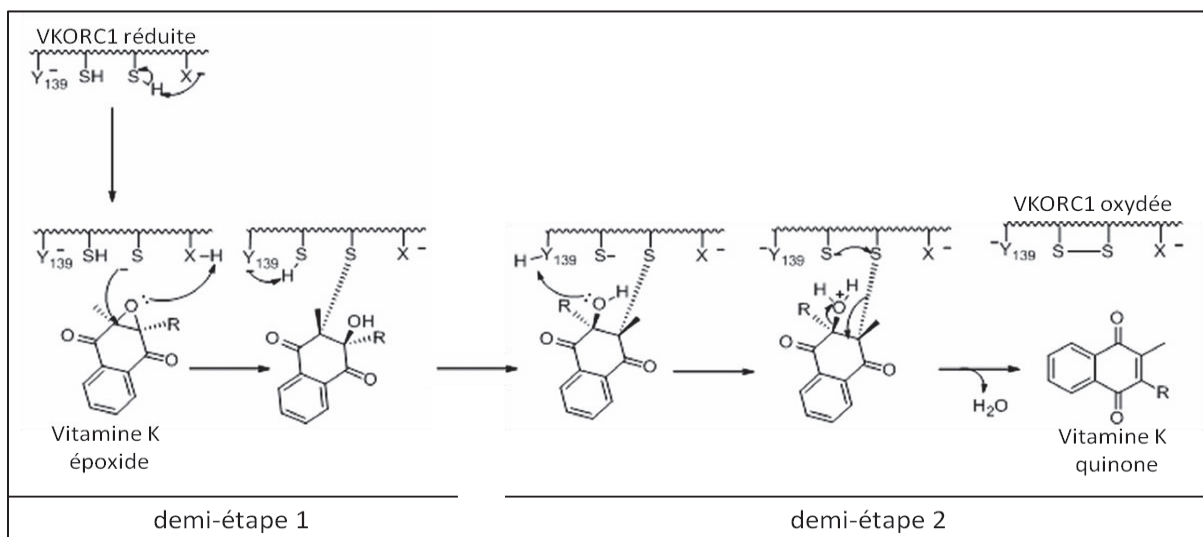


Figure 27 : Mécanisme réactionnel de la réduction de vitamine K époxyde en vitamine K quinone  
(Matagrín *et al.*, 2013)

Cette séquence réactionnelle reste toujours d'actualité, cependant aucune étude n'a permis de confirmer ce modèle depuis la découverte de VKORC1. De plus, le ou les partenaires réducteurs primordiaux à la régénération de la VKORC1 réduite n'ont pas été identifiés *in vivo* malgré de nombreuses recherches sur le sujet. Pour les études enzymatiques réalisées *in vitro*, le dithiothréitol (DTT) est le réducteur utilisé, notamment par notre laboratoire.

## 2. VKORC1L1

En 2004, le séquençage systématique de génome humain a mis en évidence l'existence d'un gène paralogue à *vkorc1*. Ce gène fut nommé *vkorcIII*, du fait de l'existence de motifs très similaires à ceux retrouvés dans *vkorc1*, *vkorcIII* résulterait probablement de la duplication d'un gène ancestral à *vkorc1*. *vkorcIII*, comme *vkorc1*, est composé de 3 exons et code pour une protéine, nommée VKORC1L1, de 176 acides aminés (124). VKORC1L1 présente plus de 60% d'homologie avec VKORC1. D'ailleurs, le motif CXXC décrit comme site catalytique de VKORC1 est également présent chez VKORC1L1. De plus, les cystéines 43 et 51 ainsi que la tyrosine 139 sont également conservées chez VKORC1L1. Cette protéine est très fortement conservée entre les espèces, ainsi les séquences protéiques sont identiques à 100% entre rats et souris et à 97% entre l'homme et les rats/souris.

En 2011, Westhofen *et al* ont proposé une topologie de VKORC1L1, calquée sur celle de VKORC1 proposée par Watzka (136). Ainsi, VKORC1L1 posséderait également 4 domaines



transmembranaires, et les extrémités N et C terminales seraient localisées du côté cytoplasmique du réticulum endoplasmique (figure 28).

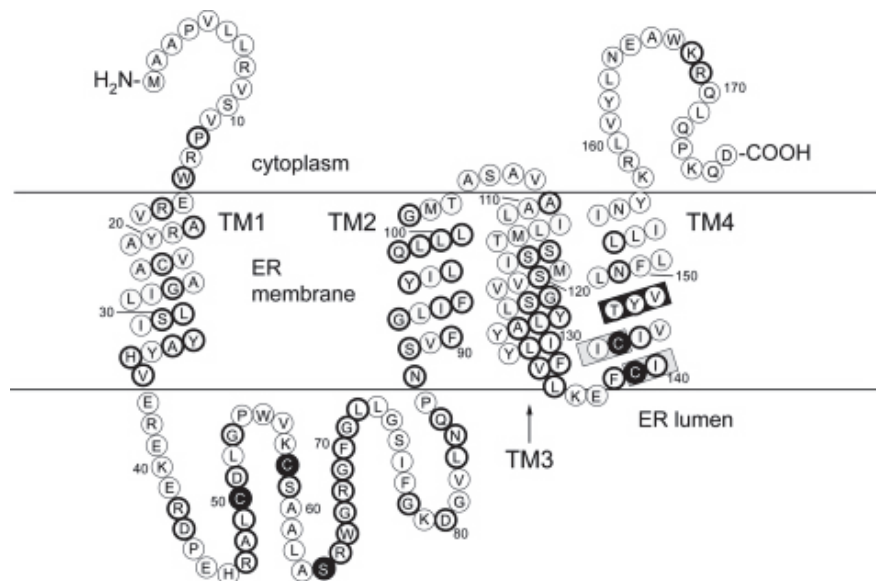


Figure 28 : Topologie de VKORC1L1 d'après Westhofen *et al* (136)

Avant 2011, l'enzyme VKORC1 était considérée comme la seule enzyme capable d'effectuer l'activité VKOR. Cependant, Westhofen et son équipe ont démontré, après expression hétérologue de VKORC1L1 en cellules HEK 293T, que VKORC1L1 possède une activité vitamine K époxyde réductase. En 2013, Hammed *et al* ont exprimé VKORC1L1 en levure *Pichia pastoris* afin d'étudier ses propriétés catalytiques. Ils ont remarqué que VKORC1L1 était 50 fois plus résistante aux AVKs que VKORC1 (137). De plus, *vkorc1l1* serait faiblement transcrit dans les tissus hépatiques (137,138) : de ce fait, dans le foie, VKORC1L1 ne permettrait pas la  $\gamma$ -carboxylation des facteurs de coagulations (via GGCX). En revanche, des transcrits de VKORC1L1 sont retrouvés en forte quantité dans les tissus extra-hépatiques, comme le cerveau, les testicules etc (137,138). En ce qui concerne le cerveau, Westhofen a proposé l'hypothèse que VKORC1L1, de par son activité vitamine K époxyde réductase, permettrait de lutter contre le stress oxydant (136). En revanche, dans les autres tissus extra-hépatiques, VKORC1L1 permettrait la  $\gamma$ -carboxylation des PVKDs comme l'OC, la MGP ou Gas6 afin d'assurer leur fonctionnement. D'ailleurs, Spohn en 2009 a montré, en utilisant des souris *vkorc1*<sup>-/-</sup>, que ces souris étaient incapables de  $\gamma$ -carboxyler les facteurs de coagulation, mais en revanche, elles étaient capable de  $\gamma$ -carboxyler la MGP dans les parois artérielles afin de prévenir les calcifications ectopiques (128). En conséquence, VKORC1L1 pourrait être une voie de supplémentation à VKORC1 dans les tissus extra-hépatiques.



## **B. Activité VKR**

L'activité VKR correspond à la réduction de la vitamine K quinone en vitamine K hydroquinone. Cette réaction peut être réalisée par VKORC1 et VKORC1L1, mais en majorité, elle est catalysée par une NADPH quinone oxydoréductase, appelée également DT-diaphorase. Pendant de nombreuses années, NQO1 était considérée comme l'enzyme permettant de catalyser cette réaction. En effet, NQO1 est capable d'effectuer la réduction de la vitamine K quinone en hydroquinone (139). De plus, en cas d'intoxication aux AVKs, l'antidote est la vitamine K quinone, qui sera ensuite réduite en hydroquinone, et ce malgré la présence de d'AVKs bloquant la VKORC1. Donc l'enzyme réalisant cette réaction n'est pas VKORC1 et est insensible aux AVKs. Il s'avère que NQO1 est très peu sensible aux AVKs (139). Pour toutes ces raisons NQO1 semblait être l'enzyme catalysant cette activité VKR. Cependant, une étude menée par Ingram et son équipe en 2013, portant sur des souris  $nqo1^{-/-}$ , a révélé que ces souris  $nqo1^{-/-}$  ne présentaient pas de modification de leur activité VKR, comparé à des souris sauvages (140). Ainsi NQO1 ne serait pas l'enzyme majeure responsable de l'activité VKR.

## **V. Inhibition de l'activité VKOR**

### **A. Historique par AVKs et découverte de la warfarine**

Les AVKs ont été découverts grâce à leur effet indésirable. Tout débuta en effet dans les années 1920, aux Etats Unis et au Canada, lorsque des hémorragies spontanées survinrent dans des troupeaux de bétail ayant consommé du mélilot doux avarié. En 1922, le vétérinaire pathologiste Frank Shofield rapporta que ces hémorragies étaient dues à l'ingestion par les animaux d'ensilage moisi obtenu à partir de mélilot, et il nota un temps de coagulation allongé chez ces animaux. Il constata également que le retrait du trèfle doux de l'alimentation du bétail permettait leur guérison (141). En 1937, Quick constata une diminution du taux de prothrombine chez ces animaux atteints de cette maladie hémorragique. En 1939, l'équipe de Karl Paul Link isola l'agent responsable de ces hémorragies : la 3,3'-diméthylène-4-hydroxycoumarine, il la synthétisa la même année et la nomma dicoumarol. Il montra également qu'un traitement avec de la vitamine K1 contrait les effets du dicoumarol, conférant ainsi au dicoumarol un rôle d'anticoagulant anti-vitamine K (142). Il s'avère que le Mélilot moisit contenait du dicoumarol, son action anticoagulante a également été mise en évidence lors de tests chez le lapin (143). Cette molécule explique la toxicité du trèfle avarié, en revanche le trèfle frais est lui inoffensif. Lors de la dégradation du trèfle doux, la coumarine va être oxydée en 4-hydroxycoumarine, cette molécule sera ensuite couplée à du formaldéhyde et sera dimérisée pour former le dicoumarol.

Après la découverte du dicoumarol, l'équipe de Link développa 106 analogues du dicoumarol. Un de ces analogues fut retenu et développé comme raticide : la warfarine (warf en l'honneur de la Wisconsin alumni research foundation et le suffixe « arin » pour coumarine). Dès 1948, l'activité anticoagulante de la warfarine promut cette molécule au rang de rodenticide. Cependant, en 1951, il y eut une intoxication à la warfarine chez l'homme, sans conséquence dramatique, mais cela a suggéré l'utilisation de la warfarine à des fins thérapeutiques chez l'homme. En 1953, des essais cliniques démarrèrent aux Etats Unis, sur l'utilisation de la warfarine. Son utilisation en médecine humaine connut un essor fulgurant lorsque le président américain Eisenhower bénéficia d'un traitement à la Warfarine à la suite d'une crise cardiaque en 1955 (144).

A l'heure actuelle, les AVKs sont utilisés en médecine humaine afin de prévenir les maladies thrombo-emboliques et sont également utilisés en tant que rodenticides afin de gérer les populations de rongeurs. Les AVKs agissent, dans les deux cas, de la même manière en

inhibant la synthèse de certains facteurs de coagulation. Cependant les molécules utilisées en médecine humaine et celles utilisées comme rodenticides sont différentes, hormis la warfarine.

## B. Structure et propriété des AVKs

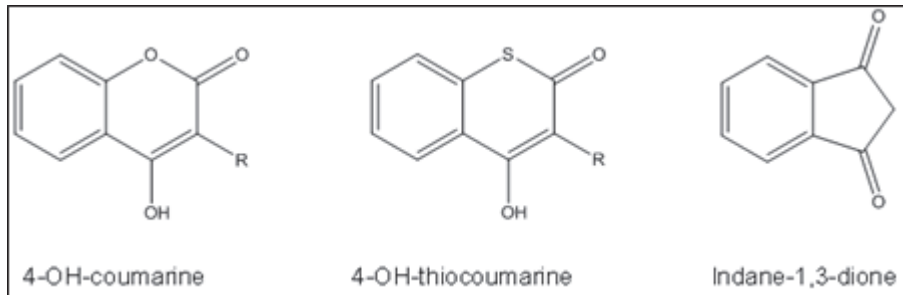


Figure 29 : Structure chimique des trois familles d'AVKs

Les AVKs peuvent être classés en trois grandes familles (Figure 29) :

- Les dérivés de la 4-hydroxycoumarine : avec la warfarine, le coumatétralyl, la bromadiolone, le difénacoum, le brodifacoum et le flocoumafène ;
- Les dérivés de la 4-hydroxythiocoumarine : avec la diféthialone ;
- Les dérivés de l'indane-1,3-dione : avec la chlorophacinone.

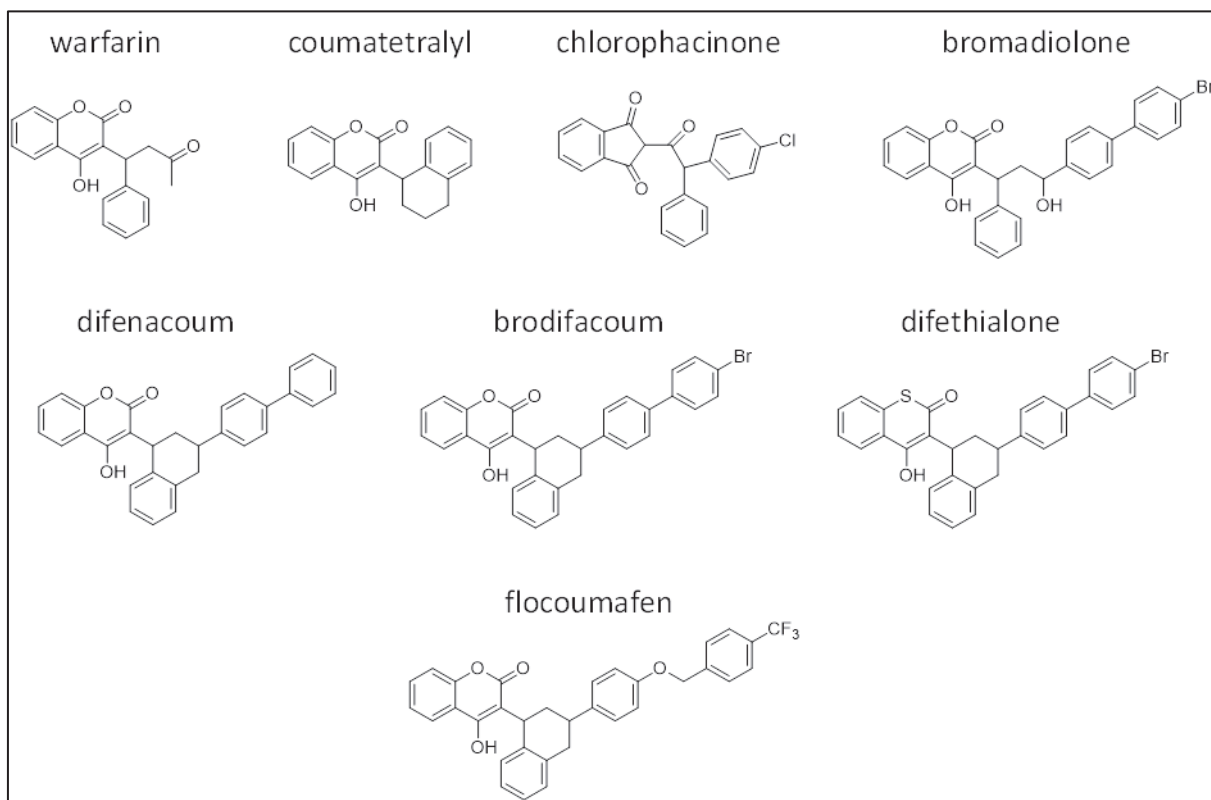
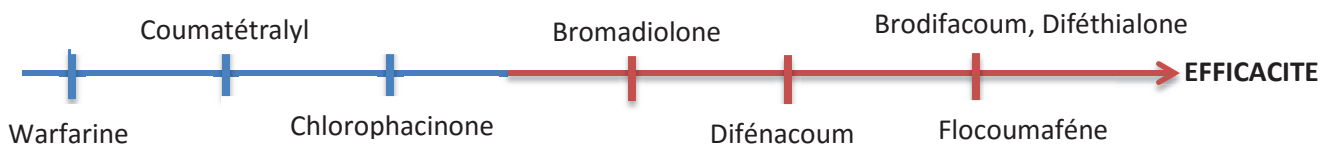


Figure 30 : Structure chimique des rodenticides les plus utilisés

Tous les AVKs cités sont utilisés comme rodenticides afin de gérer les populations de rongeurs. Actuellement, les AVKs peuvent être divisés, selon leur efficacité, en deux générations :

- Les AVKs de première génération, avec la warfarine, le coumatétralyl et la chlorophacinone: ce sont des AVKs possédant une efficacité modérée requérant d'être consommé durant plusieurs jours afin d'être pleinement actifs ;
- Les AVKs de seconde génération, avec la bromadiolone, le difénacoum, la diféthialone et le flocoumafène : ces AVKs sont très efficaces, une prise durant une seule journée est suffisante pour engendrer la mort.



Certaines personnes classent les AVKs en trois générations plutôt que deux, en mettant la bromadiolone et le difénacoum dans la catégorie des secondes générations.

Cependant, j'ai fait le choix personnel de prendre la classification des AVKs en deux générations pour la suite de ce mémoire. Ce classement en terme d'efficacité a été réalisé selon nos résultats issus d'études *in vitro* et *in vivo*.

Les AVKs présentent une analogie structurale avec la vitamine K. Leurs propriétés physicochimiques varient en fonction de la nature de leur chaîne latérale et de la présence ou non d'halogènes ou d'un hétéroatome de soufre. Ils sont faiblement solubles dans l'eau et faiblement volatiles.

## C. Métabolisme chez le rat

### 1. Généralités

Les AVKs sont généralement administrés par voie orale. Leur absorption par le tractus intestinal se fait au niveau de l'estomac et du jéjunum. Leur biodisponibilité par voie orale est proche de 100%. Une intoxication par voie cutanée à la warfarine a déjà été décrite au Vietnam (145). Une fois les AVKs dans la circulation sanguine, ils vont se lier de façon réversible à l'albumine (à 97%). Seule la fraction libre est active et métabolisée. La fraction liée, quant à elle, sert de réservoir à l'activité anticoagulante. Une fois la fraction libre arrivée au niveau du foie, les AVKs sont alors métabolisés par les mono-oxygénase et les enzymes de phase II du réticulum endoplasmique hépatiques. Le métabolisme hépatique est réalisé par les cytochromes P450 (CYP). Le type de CYP-450 impliqué varie en fonction de l'espèce et de la molécule (146). Chez le rat, les principaux cytochromes impliqués sont le CYP3A, les CYP2C11 et 2C12 ainsi que les CYP2B et 1A. De plus, il existe des spécificités en fonction des sous familles de CYP-450 selon le sexe de l'animal. Par exemple, chez le rat, les femelles sur-expriment le CYP2C12 et sont dépourvues de CYP3A, tandis que les jeunes mâles sous-expriment le CYP2C11. Chez l'homme, de nombreuses études ont mis en évidence une différence de temps de coagulation entre hommes et femmes (147), d'où peut-être une métabolisation différente. De plus, le principal cytochrome impliqué dans le métabolisme des AVKs chez l'homme est le CYP2C9. Cependant, 3 variants de ce cytochrome existent, le 2C9\*<sup>1</sup>, le 2C9\*<sup>2</sup> et le 2C9\*<sup>3</sup>. Selon le variant, Eriksson *et al* ont montré que la métabolisation était fortement modifiée, ainsi la dose thérapeutique de warfarine devait être adaptée selon le variant (tableau 3) (148).

Tableau 3 : Doses de warfarine recommandées selon le variant CYP2C9 (Erickson *et al* (148))

Ranges of recommended warfarin doses (mg/day) from the US FDA drug label.					
CYP2C9 (mg/day)					
*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
5-7	5-7	3-4	3-4	3-4	0.5-2

Enfin, l'excrétion après métabolisation est principalement fécale. La cinétique d'élimination des AVKs est biphasique avec une première phase rapide de quelques heures, puis une seconde phase beaucoup plus longue de plusieurs semaines (40).

En ce qui concerne la warfarine, des études ont montré qu'elle est capable de traverser la barrière placentaire et ainsi d'induire une dysmorphie faciale incluant une hypoplasie nasale chez l'enfant par la suite, que l'on nomme « Fetal warfarin syndrom » (149). La Warfarine présente donc un risque reprotoxique. A ce jour, ce risque reprotoxique n'a été prouvé que pour cette molécule.

## 2. Exemple du métabolisme de la warfarine chez le rat

Peu d'informations sont connues sur le métabolisme des AVKs chez les rongeurs. Cependant, le métabolisme de la warfarine a été décrit chez le rat. Ainsi, l'oxydation de la warfarine est principalement catalysée par les CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11 et CYP3A2 (150). Ce métabolisme oxydatif aboutit à la formation de cinq métabolites : les 4'-, 6-, 7-, 8- et 10-OH-warfarine (figure 31). Ces métabolites sont ensuite glucuroconjugués par l'action de l'UDP-glucuronyltransférase afin d'être hydrosolubles et excrétés dans l'urine (151).

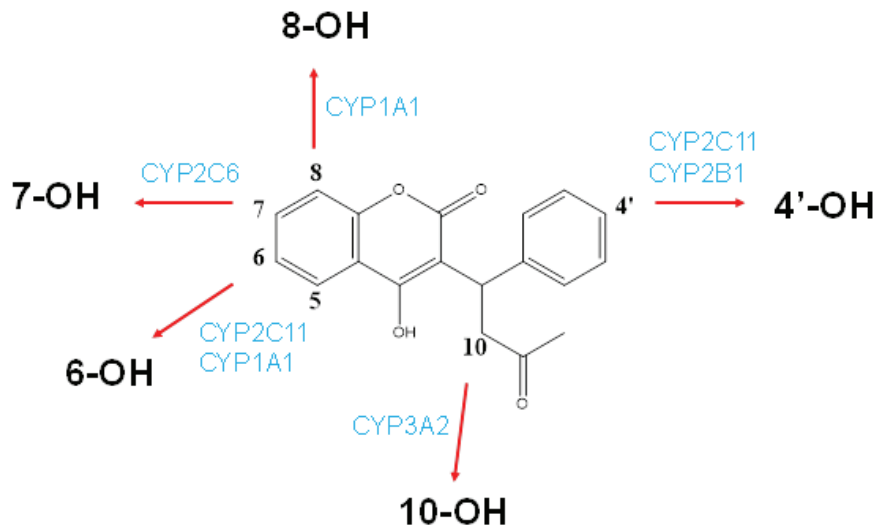


Figure 31 : Métabolisme de la warfarine chez le rat catalysé par les CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11 et CYP3A2 (151)

Le métabolisme des autres AVKs utilisés comme rodenticides reste à ce jour inexploré. Cependant, des études menées au sein de notre laboratoire semblent indiquer que le métabolisme oxydatif de la chlorophacinone est principalement médié par le CYP2B, celui du Coumatétralyl par le CYP3A et celui du difénacoum par le CYP2C11.

#### **D. Mécanisme d'action**

Les AVKs sont des anticoagulants oraux qui interviennent de manière indirecte sur la coagulation en inhibant l'activité VKOR. Ex vivo, lorsque des microsomes hépatiques de rats sont utilisés comme source d'enzyme à activité VKOR, l'inhibition est de type non compétitif et les constantes d'inhibition vont de 0,7  $\mu$ M pour la warfarine (figure 32) à 5 nM pour le brodifacoum.

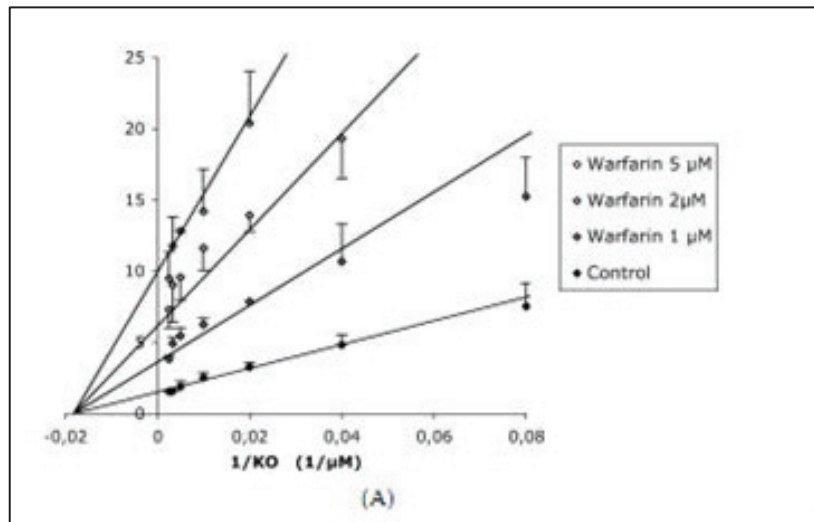


Figure 32 : Représentation de Lineweaver et Burk d'une inhibition non-compétitive de l'activité VKOR par des microsomes de foies de rats sensibles (152)

Etant donné l'homologie structurale entre les AVKs et la vitamine K époxyde, Li *et al.* (2010) proposent qu'ils partagent le même site de fixation. Toutefois, le caractère non compétitif et irréversible de cette inhibition laisse penser que l'AVK et la vitamine K époxyde ne se fixent pas au même endroit sur VKORC1 (134). Si le site de fixation des AVK n'est pas clairement défini, une hypothèse implique la tyrosine 139 de la VKORC1 dans cette liaison et plus précisément le motif TYA (Thréonine – Tyrosine – Alanine) (132,151).

Les AVK vont bloquer le cycle de recyclage de la vitamine K en inhibant deux étapes successives du cycle : la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone (activité VKOR), et la réduction de la vitamine K quinone en hydroquinone (activité VKR) par la VKORC1 (124,125). L'arrêt du cycle de la vitamine K entraîne une diminution de la vitamine K disponible et donc une diminution de l'activité gamma-glutamyl-carboxylase. Les facteurs de la coagulation vitamine K dépendants restent alors sous forme non-gamma-carboxylée et voient leur activité pro-coagulante fortement diminuée : ils sont alors appelés PIVKA (protein induced by vitamine K antagonist). Leur dosage dans le plasma permet de caractériser un état de subcarence en vitamine K. Les facteurs de coagulation étant sous forme non-gamma-carboxylée, le calcium ne peut pas être fixé par la pince « di-carboxylique », ce qui empêche l'interaction avec les phospholipides anioniques plaquettaires. Les AVK induisent ainsi une augmentation du temps de coagulation et retardent la formation de fibrine.

En dépit de leur utilisation intensive dans le monde entier, le mode d'action des antagonistes de la vitamine K est resté incertain. Le mécanisme d'inhibition proposé par Silverman (1980)



implique l'acylation par l'inhibiteur d'une des 2 cystéines du site catalytique de VKOR ou éventuellement d'un acide aminé nucléophile et proche dans l'espace. Le thioester produit (si une des 2 cystéines est le nucléophile) rendrait compte du caractère irréversible de l'inhibition et de son mécanisme non compétitif. Cependant, l'instabilité relative de ce thioester rendrait sa mise en évidence difficile à pH neutre.

D'autres études indiquent que l'effet inhibiteur de la warfarine serait plus important lorsque la VKOR est incubée avec l'inhibiteur préalablement à l'introduction du dithioérytol (153). Les auteurs en concluent que la warfarine interagirait avec la VKOR oxydée et bloquerait la réduction de la VKOR contredisant le mécanisme décrit par Silverman (1980). Enfin, plus récemment, Rishavy *et al.* proposent l'hypothèse selon laquelle la fixation de la warfarine constituerait une barrière empêchant la cascade de transfert d'électrons nécessaire à l'activation de la VKORC1 (134).

Egalement, Gebauer *et al* ont montré le rôle essentiel du groupement OH en position 4 de la structure coumarinique (154). Ainsi, même une méthylation de ce groupement inhibe l'effet inhibiteur des dérivés coumariniques. Considérant le mécanisme d'action du recyclage de la vitamine K présenté par Matagrín en 2013 (figure 27), il est possible de concevoir que l'OH en position 4 de la coumarine puisse être considéré par l'enzyme VKORC1 comme le métabolite réduit de l'époxyde de vitamine K. VKORC1 essayerait de poursuivre son action (demi étape 2), sur la 4-hydroxycoumarine et ne pouvant pas déshydrater la 4-hydroxycoumarine (contrairement au métabolite réduit de l'époxyde de vitamine K), l'enzyme serait alors bloquée à ce stade. Elle ne pourrait pas libérer la 4-hydroxycoumarine, car la sortie de la vitamine K réduite n'est possible que par la modification conformationnelle de VKORC1 induit par la création du pont disulfure C132-C135.

Le mécanisme d'inhibition des AVKs n'est toujours pas clairement établi à ce jour.

## **E. Ecotoxicité secondaire**

Depuis la découverte de la warfarine comme rodenticide, les AVKs ont remplacé les toxiques aigus directs comme la Strychnine. Le mode d'action retardé des AVKs permet de contourner les problèmes d'aversion alimentaire, ce qui rend ces AVKs très efficaces pour gérer les populations de rongeurs, en milieu urbain comme rural. Cependant, l'utilisation intensive des AVKs a eu pour conséquence la sélection de rongeurs résistant aux AVKs de première génération (155). Ce phénomène de résistance a conduit au développement de

nouveaux AVKs : les AVKs de seconde génération que l'on connaît aujourd'hui sous le nom de difénacoum, brodifacoum, diféthialone et flocoumafène. Ces AVKs de seconde génération sont beaucoup plus efficaces que ceux de la première génération, mais ils présentent également des demi vies hépatiques plus longues et une lipophilie plus importante, entraînant une augmentation de la persistance dans le corps de l'animal intoxiqué (156). En effet, le coefficient de partage (Log Kow pour octanol/ eau) pour les AVKs de première génération est inférieur à 5. Ainsi, leur bio-accumulation dans l'organisme est faible. En revanche, les secondes générations ont un Log Kow entre 5,17 et 8,5, et possèdent en conséquence un grand potentiel de bio-accumulation (157). Les AVKs vont s'accumuler dans le foie (tableau 4).

Tableau 4 : Données expérimentales établies chez le rat (40)

		Formule brute	DL 50 aigu oral mg kg <sup>-1</sup>	Demi-vie dans le foie
<b>Première génération</b>	<b>Warfarine</b>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	186	67 jours
	<b>Coumatetralyl</b>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	16,5	55 jours
	<b>Chlorophacinone</b>	C <sub>23</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> Cl	6,26	35 jours
<b>Seconde génération</b>	<b>Bromadiolone</b>	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> BrO <sub>4</sub>	1,125	170-318 jours
	<b>Difénacoum</b>	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	1,8	128 jours
	<b>Brodifacoum</b>	C <sub>31</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub>	0,27	113-350 jours
	<b>Diféthialone</b>	C <sub>31</sub> H <sub>23</sub> BrO <sub>2</sub> S	0,56	74-126 jours
	<b>Flocoumafène</b>	C <sub>33</sub> H <sub>25</sub> F <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,25	215 jours

Les demi-vies plus longues vont engendrer des problèmes d'écotoxicité secondaire. En effet, un rat intoxiqué par un AVK, étant plus faible, aura plus de risques de se faire attraper et consommer par un prédateur tel qu'un renard ou une buse. En mangeant un seul rat intoxiqué, le prédateur ne risque pas de développer de signes cliniques dus aux AVKs. Cependant, en consommant plusieurs rats intoxiqués, alors le prédateur sera lui-même intoxiqué et mourra : écotoxicité secondaire : la faune non cible est touchée.

De nombreuses études ont mis en évidence des cas d'empoisonnement de la faune sauvage aux AVKs, notamment pour les renards et les oiseaux. En effet, en France, la réduction de la densité de renard (*Vulpus vulpus*) a été associée avec l'utilisation de la Bromadiolone pour gérer les populations de campagnols (*Arvicolas terrestris*) (158). Une observation similaire a été effectuée au Canada (159). Une étude réalisée en Allemagne en 2015, sur le dosage d'AVK dans le foie de renard, a montré que sur 331 foies analysés, 59,8% présentaient des résidus d'AVKs, et principalement des résidus de seconde génération : de la bromadiolone et du brodifacoum (160). Concernant l'intoxication secondaire des oiseaux aux AVKs, cela a été décrit dans de nombreux pays : en Ecosse, en Grande Bretagne, aux USA, en Nouvelle Zélande, au Canada, en Espagne et en France (160).

Enfin, la faune sauvage n'est pas la seule faune touchée par l'intoxication aux AVKs. En effet, des études montrent un empoisonnement régulier d'animaux domestiques par des AVKs (161).

## VI. Résistance aux AVKs chez les rongeurs

### A. Historique

L'utilisation des AVKs avec l'introduction de la warfarine dans les années 1950 a marqué un tournant dans la gestion des populations de rongeurs. Cependant, peu de temps après le début de l'utilisation de la warfarine, des résistances à ce produit ont commencé à apparaître. Ainsi, le phénomène de résistance est apparu pour la première fois en Ecosse chez *Rattus norvegicus* (162), puis ce fut le cas de *Mus musculus domesticus* en 1960 (163). Bien que l'Ecosse fût le premier pays à rapporter le problème de rats bruns résistants, le phénomène s'est largement étendu, non seulement en Europe mais dans le monde entier (tableau 5).

Tableau 5 : Statut de la résistance dans le monde par Pelz en 2005 (164)

Country	<i>R. norvegicus</i>	<i>R. rattus</i>	<i>M. m. domesticus</i>	Reference
Belgium	+		+	Lund (1984); Baert (2003)
Denmark	+	+	+	Myllymäki (1995); Lodal (2001)
Finland			+	Myllymäki (1995)
France	+	+	+	Myllymäki (1995)
Germany	+	+	+	Myllymäki (1995); Pelz (2001)
United Kingdom	+	+	+	Myllymäki(1995); Kerins <i>et al.</i> (2001)
Italy	+			Alessandroni <i>et al.</i> (1980)
The Netherlands	+		+	De Jonge (1994)
Sweden			+	Lund (1984)
Switzerland			+	Muhr (1981)
Canada	+		+	Siddiqi and Blaine (1982)
United States	+	+	+	Jackson and Ashton (1986)
Japan		+		Naganuma <i>et al.</i> (1981)
Australia		+		Saunders (1978)

Les premières études menées sur la résistance débutèrent à partir de rats capturés en Ecosse, qui avaient l'aptitude à survivre en consommant des AVKs en une quantité normalement mortelle. Afin de pallier le manque d'efficacité des AVKs de première génération, des AVKs de seconde génération ont vu le jour entre 1970 et 1980, avec la bromadiolone et le difénacoum, puis plus tard le brodifacoum, la diféthialone et le flocoumafène (164). Cependant, des résistances à ces AVKs (bromadiolone et difénacoum) ont par la suite été rapportées (165,166).

De nombreuses définitions du mot « résistance » existent. Cependant, celle de Greaves *et al* en 1994 semble la plus efficace : « la résistance aux anticoagulants correspond à une **perte majeure d'efficacité** de ces derniers, lors d'une utilisation **correcte** dans des **conditions normales**. Cette perte d'efficacité est due à la présence de rongeurs possédant une sensibilité aux anticoagulants **notablement réduite** et **transmise génétiquement** » (167). Les mots « utilisation correcte » et « condition normale » revêtent une grande importance car une population de rongeurs peut ne pas mourir à la suite d'un traitement aux AVKs, que ce soit des AVKs de première ou de seconde génération, sans pour autant présenter une résistance. En effet, il suffit, tout simplement, que les rongeurs ne consomment pas l'appât. Cela est souvent constaté lorsqu'il y a une compétition alimentaire importante sur le site, ainsi les rongeurs mangeront la nourriture qu'ils ont l'habitude de consommer et non l'appât, et donc ils ne mourront pas. En revanche, dans le cas de la consommation : « une sensibilité aux AVKs notablement réduite et transmissible génétiquement », c'est de la Résistance. Deux types de résistance peuvent être distingués :

- la Résistance de Cible : due à des mutations sur le gène *vkorc1* ;
- la Résistance Métabolique : due aux cytochromes P-450.

## **B. Résistance de Cible**

### **1. Historique**

De nombreuses expériences ont été réalisées afin de découvrir quelle était l'origine de la résistance aux AVKs. Chez les rongeurs et notamment chez le rat brun (*Rattus norvegicus*), une forte implication de facteurs génétiques dans la résistance aux AVK fut très tôt suspectée. Ainsi, un travail de comparaison réalisé entre le test BCR (Blood Clotting-Response) et le statut génétique de rat avant ou après croisement avec des rats standards (168) permit de suspecter l'existence d'un gène de la résistance qui fut appelé *Rw* (War chez la souris). Ce gène *Rw* fut ensuite localisé sur le chromosome 1 du rat (169,170). Puis sa localisation fut de plus en plus précise suite aux travaux de Kohn et Pelz (171,172) par le suivi de la liaison du gène *Rw* avec un microsatellite D1Arb18 (171), puis avec 8 microsatellites (172), puis enfin avec 26 microsatellites recouvrant une région de 32 cM (centiMorgan) incluant le gène *Rw*. La liaison la plus intense a été observée pour D1rat219. Ainsi, le marqueur D1Rat219 contenu dans cette région estime la résistance correctement chez 91% des rats testés. Il est le meilleur

marqueur de la résistance même si d'autres marqueurs potentiels sont modifiés par déséquilibre de liaison. En conséquence, les auteurs localisent le locus *Rw* dans une zone de 2,2 cM autour de D1rat219 (173). Enfin, Rost *et al* en 2004 et Li *et al* en 2004 ont identifié le gène *vkorc1* comme gène codant pour l'activité VKOR et son polymorphisme comme étant responsable de la résistance observée chez les rats et les souris.

## 2. Polymorphisme *vkorc1*

Après la découverte de *vkorc1*, ce gène fut l'objet de nombreuses études et de nombreux polymorphismes du gène *vkorc1* ont été découverts (164,174). Les mutations découvertes sont des SNP pour « Single-Nucleotide-Polymorphism », c'est-à-dire qu'un nucléotide va muter, donc être remplacé par un autre nucléotide. Ainsi lors de la transcription de *vkorc1* et de la traduction de la protéine VKORC1, cela va entraîner un changement d'acide aminé.

### a) Rat

En 2005, Pelz et son équipe ont réalisé une étude afin de découvrir la distribution géographique des résistances chez le rat brun en Europe (figure 33).

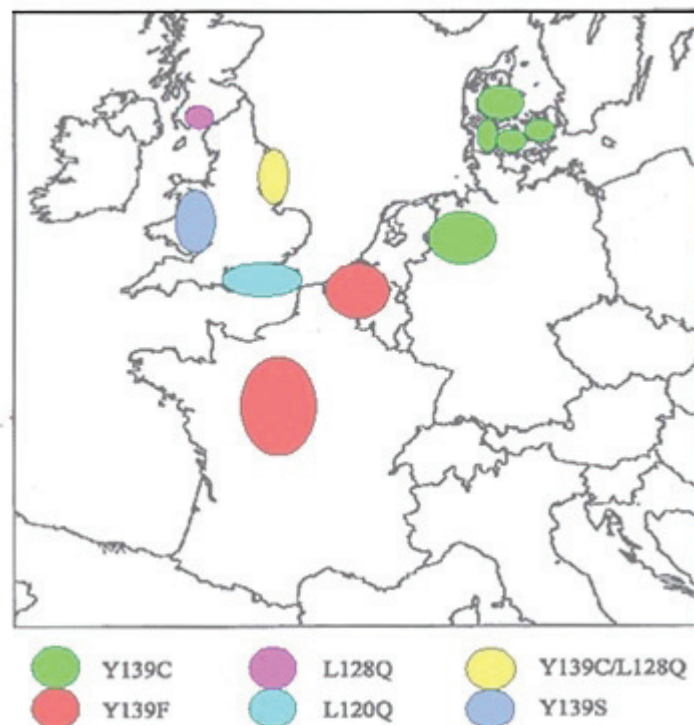


Figure 33 : Distribution géographique des mutations retrouvées chez le rat brun en Europe (164)

Ainsi, ils découvrirent cinq mutations associées à de la résistance aux AVKs en Europe. Ces cinq mutations présentaient une distribution géographique bien précise avec Y139C en Allemagne, Y139F en France, Y139S au Pays de Galle, L120Q en Angleterre et L128Q en Ecosse. Une étude plus récente réalisée par Grandemange *et al* en 2010 a mis en évidence une distribution plus complexe de ces mutations, puisque l'ensemble de ces mutations ont été retrouvées en France (figure 34) (175). La mutation Y139F est tout de même la mutation la plus répandue en France.

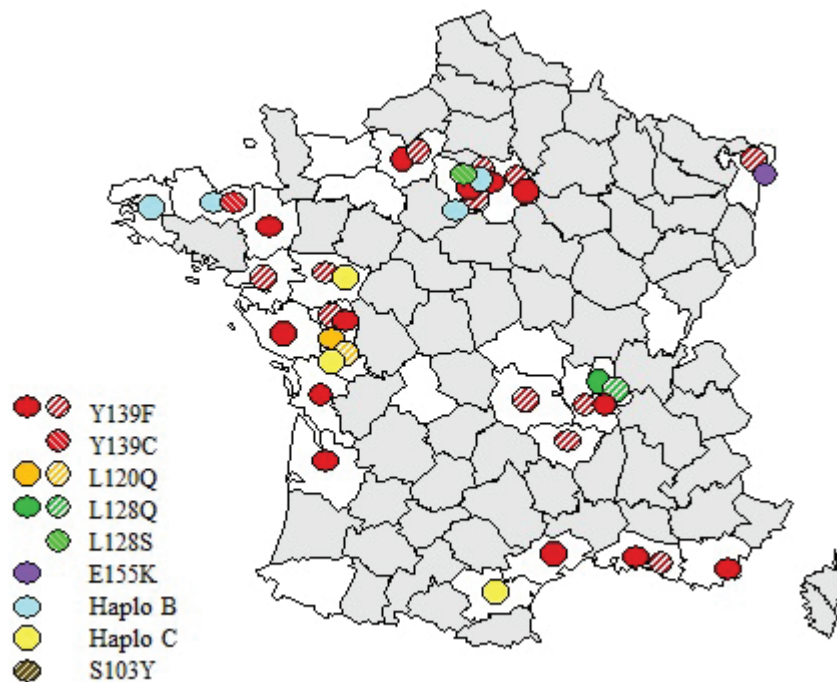


Figure 34 : Distribution géographique de la résistance chez *Rattus norvegicus* en France par Grandemange (175)

Rost et son équipe ont également étudié ce phénomène de résistance. Ils ont analysé 250 échantillons de rats et de souris provenant du monde entier afin de lister les mutations potentiellement causales de résistance. A partir des mutations trouvées, ils ont caractérisé l'implication de ces SNP dans la résistance aux AVKs en exprimant les VKORC1 mutées en cellules HEK. L'activité VKOR a ensuite été évaluée sans et avec warfarine (Figure 35).

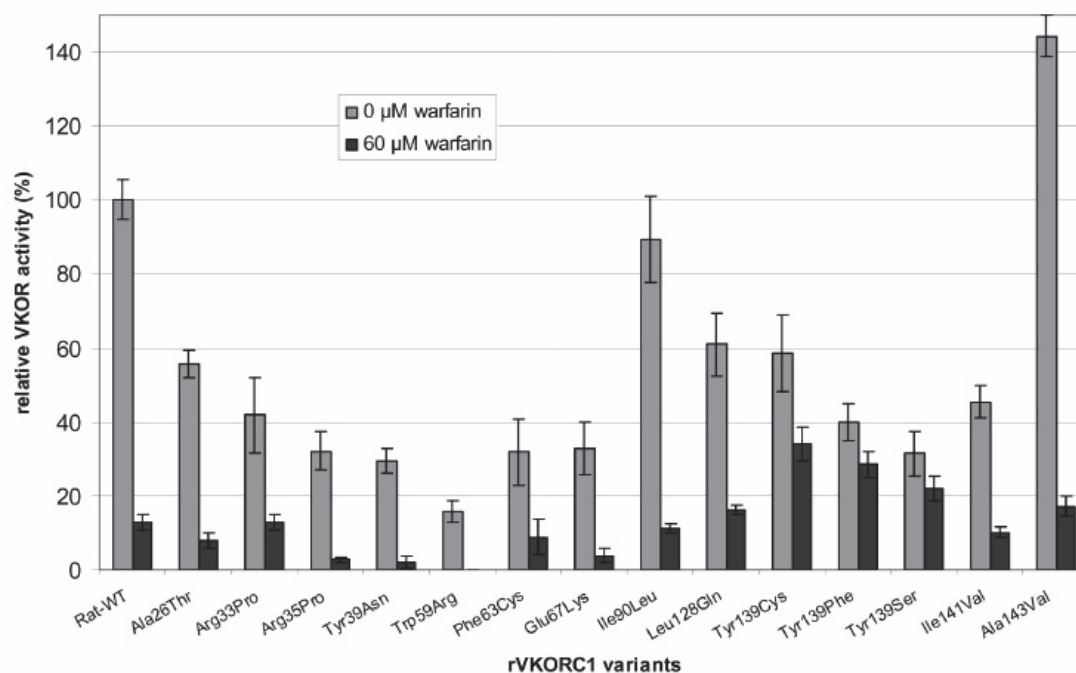


Figure 35 : Activité VKOR et inhibition par la warfarine des VKORC1 mutantes de rat ( Rost *et al* (174))

Cependant, l'expression en cellule HEK étant faible, l'exploration fonctionnelle a été très limitée : une seule concentration de warfarine à 60 μM a été utilisée. De ce fait les interprétations étaient limitées. Cependant, leur travail met en évidence qu'une mutation en position 139 a tendance à apporter une résistance à la warfarine.

Face à l'absence de données *in vitro* et à la difficulté d'en obtenir, une exploration fonctionnelle *in vivo* relative à l'étude des conséquences des mutations a donc par la suite été réalisée par Grandemange *et al* en 2009 (176). Puisque les mutations ont toujours été détectées chez des rats sauvages, il était difficile dans ces conditions d'attribuer un effet spécifique à un gène en particulier, le reste du génome restant totalement inconnu. C'est pourquoi Grandemange *et al* ont réalisé l'introgression de la mutation 139F dans le génome d'une souche de rat de laboratoire. Après 6 générations successives, la proportion du génome du rat sauvage donneur de la mutation 139F a pu être estimée à 1.56%. La taille du segment moyen inséré (centré autour de *vkorc1*) était de 28,3 Mb. Les conséquences phénotypiques associées à cette mutation ont alors pu être appréhendées. La présence de cette seule mutation est responsable de la résistance aux AVKs de première génération observée chez le rat sauvage. Cette mutation présente à l'état hétérozygote engendre un phénotype intermédiaire, démontrant une codominance entre les allèles sauvages et mutés (176).

En 2011, Hodroge *et al* ont caractérisé l'implication de ces mutations dans la résistance en exprimant les VKORC1 mutées dans la levure *Pichia pastoris* (figure 36).



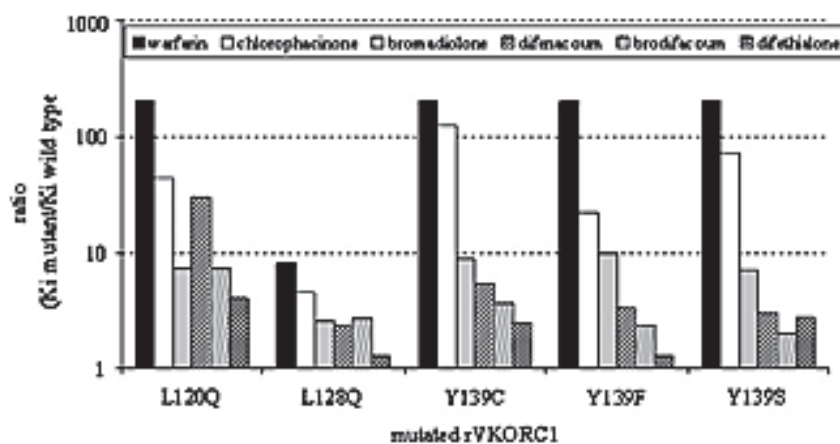


Figure 36 : Facteur de résistance des rVKORC1 mutées exprimées en levure par rapport rVKORC1 sauvage

Ils ont ainsi établi que la VKORC1 mutée seule est impliquée dans la résistance aux AVKs. De plus, ils ont travaillé en parallèle sur des microsomes de levure et sur des microsomes de foie pour chaque VKORC1 mutée et ils ont obtenu des résultats similaires, permettant ainsi d'asseoir la solidité de leur modèle.

#### b) Souris

Rost et son équipe ont également travaillé sur les SNP retrouvés chez la souris (174). Ils ont décrit huit mutations et les ont étudiées avec des cellules HEK. Cependant, les mêmes limites que pour le modèle rat étaient présentes et donc peu d'informations concrètes sur la résistance éventuelle ont été apportées. En 2001, Pelz *et al* ont décrit de nouvelles mutations sur la vkorc1 de souris (tableau 6) (177).

Tableau 6 : Mutations chez la souris retrouvées par Pelz *et al* (177)

Amino acid substitution	Populations (n)	Incidence		Homozygous (%)
		(n)	(%)	
Leu128Ser	18	185/248	75	66
Tyr139Cys	10	84/146	63	65
Arg12Trp/Ala26Ser/Ala48Thr	13	62/124	50	57
Arg61Leu	12	53/104	51	63
Glu37Gly	1	12/13	92	75
Arg58Gly	1	20/21	95	60
Trp59Leu	1	12/13	92	58
Trp59Ser	1	2/26	7	50
Leu124Gln	1	2/9	22	0

La même année, Song *et al* ont décrit une VKORC1 avec 4 mutations : R12W/A26S/A48T/R61L, cette VKORC1 est présente chez les *Mus spretus* et le gène codant pour cette enzyme est la *vkorc1 spretus*. Après un croisement initial entre *Mus spretus* et *Mus musculus domesticus*, suite à leur cohabitation en Afrique du nord et en Espagne, cela a permis l'introgession de petites parts du génome de *Mus spretus* dans celui de *Mus musculus domesticus*, dont notamment le gène *vkorc1 spretus*. Ces souris introgressées se sont ensuite reproduites avec des souris domestiques, transmettant ainsi leur gène *vkorc1 spretus* (7). Ces souris introgressées *spretus* ont été retrouvées en Espagne et en Allemagne (figure 37).

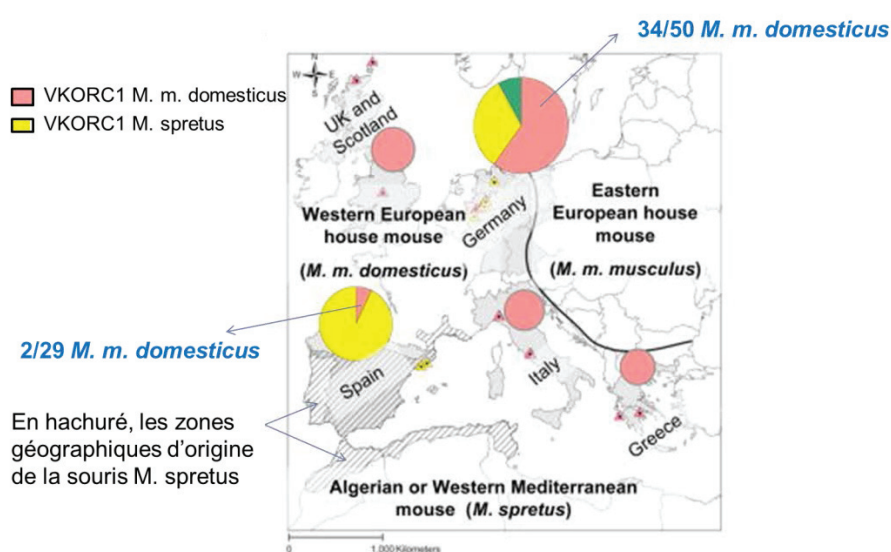


Figure 37 : Polymorphisme de *vkorc1* chez la souris domestique en Europe (Song *et al* 2011)

A partir de souris introgressées *spretus* capturées, Song et son équipe ont testé *in vivo* l'efficacité de trois AVKs afin d'étudier la résistance potentielle de ces souris aux AVKs. Concernant le Coumatétralyl et la Bromadiolone, aucune souris introgressée *spretus* n'est morte. Ces souris sont donc résistantes aux AVKs. Cependant, cette résistance est-elle seulement due à leur *vkorc1* *spretus* ou est-ce qu'il y a également une résistance métabolique associée. Cette hypothèse ne peut pas être exclue.

La Résistance de Cible, chez le rat brun, a pour conséquence une perte significative d'efficacité des AVKs de première génération ainsi qu'une partie des AVKs de seconde génération. Les rats ont la capacité de migrer sur de longues distances (via le transport de marchandise etc...) et possèdent un grand pouvoir reproducteur. Ces deux caractéristiques vont permettre la dispersion de la résistance (164). Chez le rat brun, la résistance a bien été étudiée, en revanche, pour les souris, cela est nettement moins clair.

### 3. Cytochrome P450

La résistance métabolique est connue depuis longtemps chez les insectes qui ont la capacité de détoxifier des composés chimiques par une surexpression d'enzymes. Chez les rongeurs, la résistance métabolique est principalement due à l'action des cytochromes P-450. En 2001, Sugano *et al* ont rapporté la présence de rats noirs résistants à la Warfarine à Tokyo (178). Dans les microsomes de foie de ces rats, une surexpression du CYP-3A a été trouvée, par rapport à des rats noirs sensibles (179). Or l'action de CYP-3A avait été rapportée comme permettant de diminuer l'effet des AVKs et d'augmenter la tolérance à de hautes doses de warfarine chez l'humain (180). Ainsi, chez le rat noir, la résistance a été longtemps considérée comme métabolique. Cependant, des mutations sur le gène *vkorc1* ont été décrites (164), mais sont peu connues.

Enfin, la Caluménine a été également suspectée comme mécanisme de résistance métabolique par Wallin en 2001 (181). Cependant, ce type de résistance n'a été observé nulle part ailleurs.

Une association entre résistance métabolique et Résistance de Cible est une possibilité déjà envisagée par Lasseur *et al* en 2006, Markussen *et al* en 2008 et Ishizuka *et al* en 2008, qui permettrait aux rongeurs de résister aux AVKs de deuxième génération (figure 38).

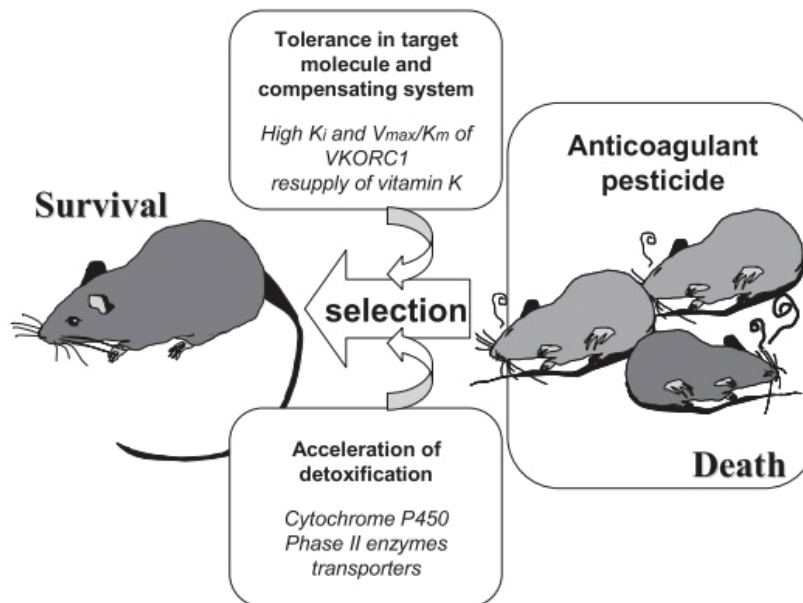


Figure 38: Association entre le mécanisme de résistance de cible et la résistance métabolique par Ishizuka (151)

### C. Coût biologique

En 1983, Fasco et son équipe découvrent que pour certains rats, l'activité VKOR conduit à la synthèse d'hydroxyvitamine K. Pour rappel, à cette période, le gène de la VKORC1 n'avait pas encore été découvert. Ils en conclurent alors que la formation de l'hydroxyvitamine K résulte d'une conversion non enzymatique (153). Ensuite, Thijssen *et al* ont reporté en 1989 qu'une mutation en position 139, chez le rat, avait pour conséquence une résistance à la Warfarine d'une part, mais d'autre part avait une activité VKOR basale plus faible par rapport à celle d'un rat sensible (182). Matagrín *et al* ont montré par la suite que des rats Y139C et Y139F avaient respectivement une activité VKOR 3 fois et 6 fois plus faible que celle des rats non mutés (183).

De plus, Watzka *et al.* ont mené une étude sur 626 patients et ont découvert que la VKORC1 Y139S produit de l'hydroxyvitamine K à hauteur de 70% (contre 30% de vitamine K quinone) (130). En 2013, notre laboratoire a éclairci le mécanisme. Selon nous, la formation d'un hydroxyvitamine K par la VKORC1 mutée en 139 ne résulte pas d'une conversion non enzymatique mais plutôt d'une modification du mécanisme réactionnel, ce qui démontre le rôle crucial de la tyrosine 139 dans ce mécanisme. L'alcool de la Tyr139 intervient dans la

protonation du groupement hydroxyle du C3 de l'intermédiaire de la vitamine K, produit après la demi-étape 1.

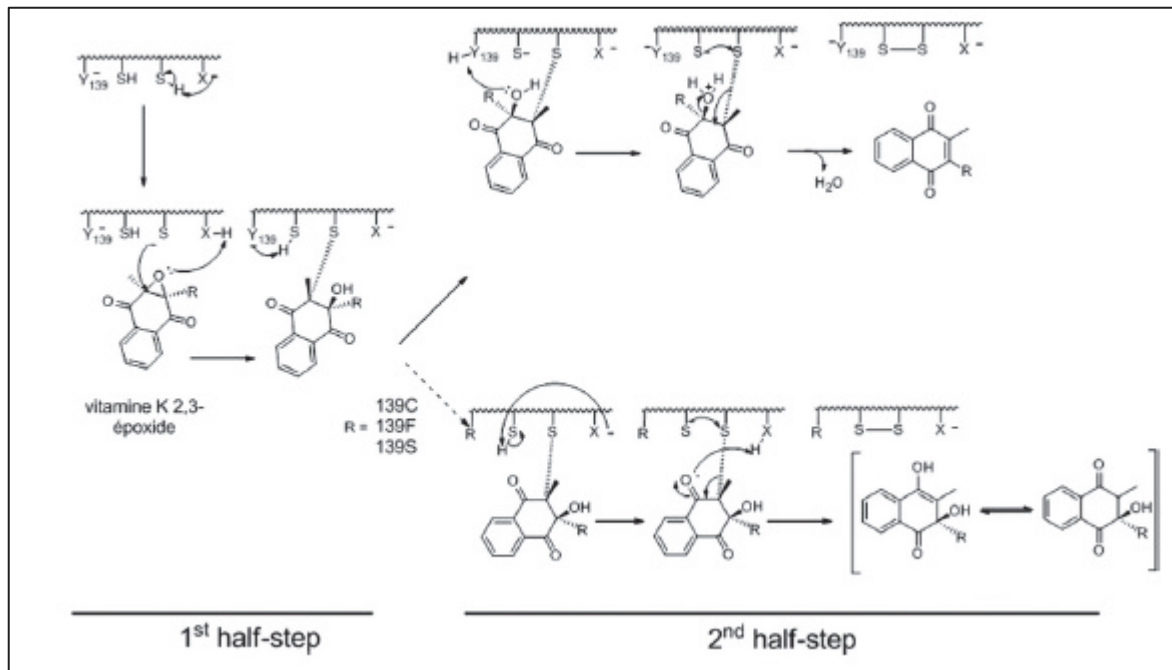


Figure 39 : Formation de 3-OH-vitamine K par VKORC1 mutée en position 139 par Matagrín *et al* 2013

En absence de tyrosine, un autre proton peut être utilisé pour produire de la vitamine K quinone mais la formation de l'hydroxyvitamine K, ne nécessitant pas de protonation, est privilégiée (figure 39). Ceci conduit également au ralentissement important de la réaction (183).

Ces répercussions sur l'activité de VKORC1 conduisent à une diminution de la concentration de vitamine K hydroquinone. Les animaux peuvent alors se retrouver en état de carence en vitamine K et cela peut avoir des conséquences néfastes non seulement pour l'activation des facteurs de coagulation, entraînant une capacité de coagulation réduite (184) mais également sur toutes les PVKD extra-hépatiques comme l'ostéocalcine ou encore la MGP. Chez le rat muté Y139C, il a été montré des calcifications artérielles, en lien direct avec la MGP. Ces calcifications ont d'ailleurs été observées au niveau de l'aorte (185). Au sein de notre laboratoire, nous avons observé des difficultés quasi systématiques dans la reproduction de certaines de nos souches de rats mutés ainsi qu'une croissance ralentie. Une relation entre des problèmes de reproduction chez des rats mutés Y139C a déjà fait l'objet d'une étude en 2011 par Jacob *et al* (186).

## Partie 3 : Objectifs de la thèse

---

Les AVKs sont utilisés pour gérer les populations de rongeurs depuis le début des années 50. Ces AVKs ont pour cible l'enzyme VKORC1 codée par le gène du même nom. Des mutations spontanées de ce gène ont été décrites comme responsables du phénotype de résistance aux AVKs chez le rat. En revanche, concernant les souris, peu d'informations sont connues sur l'impact des mutations sur la résistance. Rost *et al*, en 2009, a initié un travail sur les mutations retrouvées chez la souris et leurs conséquences en exprimant en cellules HEK les VKORC1 mutées. Cependant, due à une faible expression, ils n'ont pu observer de résultats qu'à une concentration de 60  $\mu\text{M}$  de warfarine, ce qui n'est pas raisonnable pour faire des interprétations. Hodroge *et al* ont exprimé les VKORC1 recombinantes mutées retrouvées chez *Rattus norvegicus* dans un système levure : *Pichia pastoris*. Ils ont trouvé une concordance entre l'activité VKOR du foie et l'activité de la protéine recombinante VKORC1 exprimée en levure.

Les objectifs de la thèse seront regroupés en trois axes.

### Premier objectif :

Afin de caractériser l'état de la résistance de cible chez *Mus musculus domesticus* en France et chez *Rattus rattus*, une étude en collaboration entre l'équipe 1233 et le partenaire industriel Liphatech a été mise en place. Cette étude, nommée RATAIL, consiste à récolter des échantillons de souris et de rats noirs de toute la France et à analyser la séquence du gène *vkorc1*.

**Le premier objectif de cette thèse** a été de déterminer les SNP retrouvés chez *Mus musculus domesticus* en France et chez *Rattus rattus* grâce à une étude terrain, et ensuite, à partir des mutations répertoriées, de caractériser les propriétés catalytiques des protéines recombinantes VKORC1 par un système d'expression en levure *Pichia pastoris*, afin de prédire les phénotypes correspondant à ces animaux.

### Deuxième objectif :

Song *et al* ont décrit des souris *Mus musculus domesticus* possédant une VKORC1 différente qui appartient normalement aux souris *Mus spretus*. Ils ont ainsi montré que ces souris provenaient de l'hybridation entre une souris *Mus musculus domesticus* et une souris *Mus spretus*, permettant un transfert de gène dont notamment le gène *vkorc1*. Ainsi, des souris *Mus musculus domesticus* avec la *vkorc1* *spretus* ont été retrouvées en Espagne ainsi qu'en Allemagne. Lors de l'étude Ratail des souris introgressées *spretus* ont été retrouvées en France et nous avons pu capturer ces souris et créer une lignée de souris introgressées *spretus* dans nos animaleries.

**Le second objectif de cette thèse** est d'étudier la sensibilité de ces souris aux AVKs.

- En utilisant une approche *in vivo* par des tests de sensibilité en aquarium.
- En utilisant une approche *ex vivo* basée sur les propriétés catalytiques de l'activité VKOR hépatiques de souris porteuses du gène *vkorc1* *spretus*.
- En étudiant une approche *in vitro* basée sur les propriétés catalytiques de VKORC1 portant les 4 mutations caractéristiques du gène *vkorc1* *spretus* ou chacune de ces mutations de façon isolée et enfin les différentes combinaisons possibles de doubles ou triples mutants

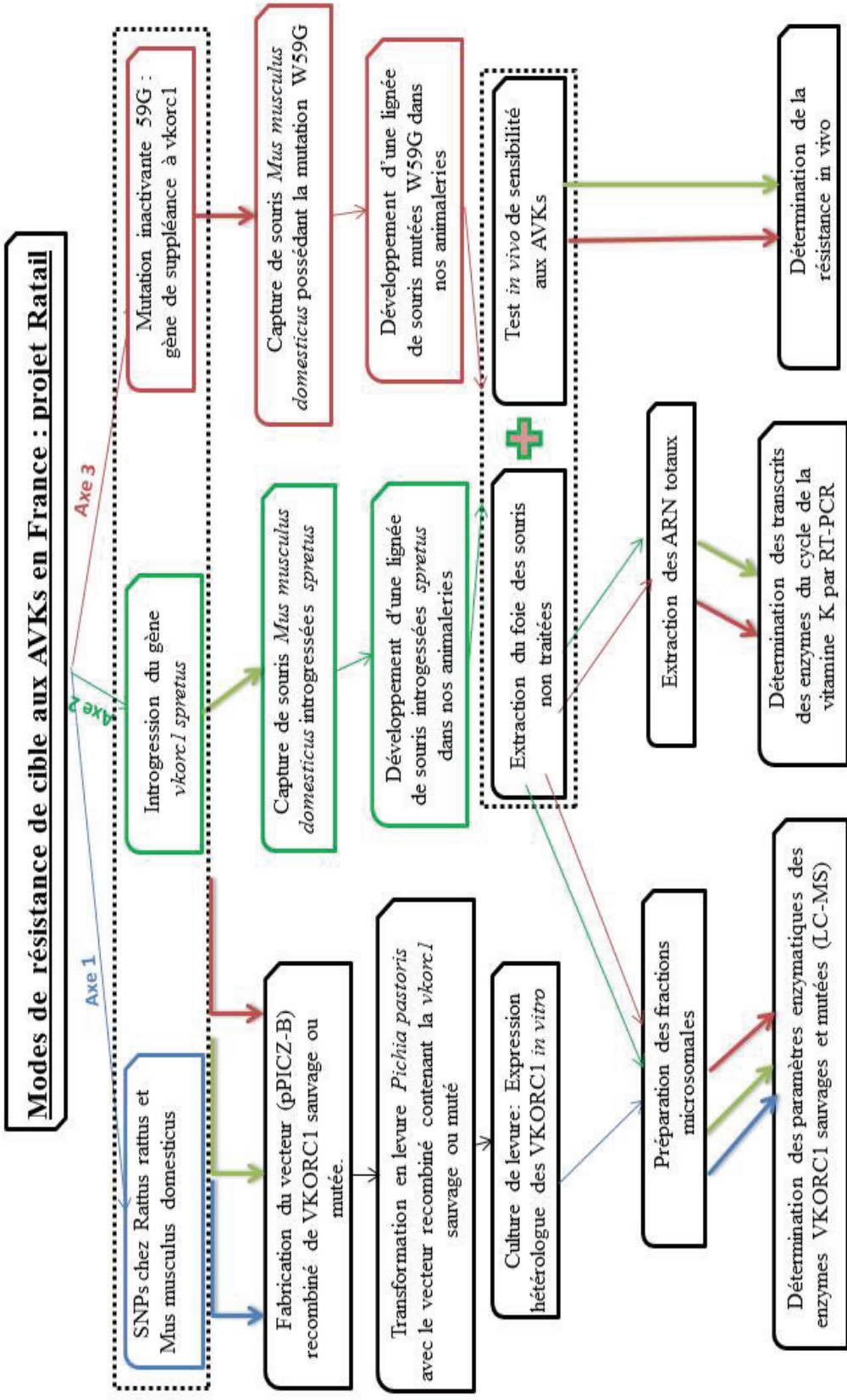
### Troisième objectif :

Enfin, lors de l'étude Ratail nous avons observé la mutation W59G. Cependant, la position 59 est décrite chez l'humain comme une mutation inactivant l'activité VKOR tout comme la mutation à l'origine du syndrome VKCFD2. La détection de ce génotype était donc parfaitement surprenante chez des souris sauvages car à l'état homozygote, ces souris auraient du présenter un syndrome hémorragique mortel.

**Le troisième objectif** de cette thèse a été de piéger puis de mettre en place une lignée de souris W59G et d'observer les conséquences de l'homozygotie sur la survie des animaux, sur la résistance aux AVKs éventuellement associée à cette mutation puis enfin d'analyser l'activité VKOR hépatique.



# Partie 4 : Stratégie expérimentale





# ***Partie 5 : Matériels et méthodes***

---

## **I. Matériels utilisés**

### **A. Réactifs de biologie cellulaire**

L'ensemble des réactifs entrant dans la composition des milieux de culture de levures et de bactéries (peptone, extrait de levure, Yeast Nitrogen Base, LB et LB Agar) provient de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). La zéocine est fournie par Invitrogen (Cergy- Pontoise, France).

### **B. Réactifs biochimiques**

Les réactifs entrant dans la composition des solutions tampons sont fournis par Sigma. La vitamine K1 et les anticoagulants warfarine, difénacoum, brodifacoum et le flocoumafène proviennent de chez Sigma-Aldrich. La chlorophacinone, la bromadiolone et la diféthialone sont données par Liphatech (Pont de Casse, France). Les vitamines K1 (Sigma) ont été oxydées en vitamine K 2,3-époxyde, selon le protocole de Tishler *et al* (187). Leur pureté (supérieure à 99 %) a été évaluée par LC/MS.

### **C. Réactifs de biologie moléculaire**

Les enzymes de restriction sont fournies par New England Biolabs (Hitchin, UK). Le vecteur d'expression pPICZB, la souche de levure *Pichia pastoris* SMD 1168, le kit de transformation des levures « *Pichia* EasyComp transformation kit » sont fournis par Invitrogen et les bactéries compétentes « Stellar Competent Cells » sont fournies par Ozyme (Montigny-le-Bretonneux, France). Les amorces utilisées pour la mutagénèse dirigée sont fournies par Eurogentec (Angers, France).

Les kits de mini-préparation et de midi-préparation d'ADN plasmidique proviennent de QIAGEN (Courtaboeuf, France). La Pfu Turbo® DNA Polymérase est fournie par Stratagene (La Jolla, CA). L'anticorps primaire polyclonal anti c-myc et l'anticorps secondaire conjugué HRP sont fournis par Ozyme.

## **D. Matériel pour test *in vivo***

Les appâts anticoagulants utilisés pour les tests en aquarium proviennent pour la warfarine 0,025%, la chlorophacinone 0,005%, la bromadiolone 0,005% et la diféthialone 0,0025% de Liphatech. Le coumatétralyl 0,0375%, le difénacoum 0,005%, le brodifacoum 0,005% et le flocoumafène 0,005% ont été achetés dans le commerce sous forme de pâte.

## **II. Méthodes expérimentales**

### **A. Etude de la résistance en France**

#### **1. Contact des professionnels**

Les professionnels de la dératisation (PCO : Pest Control Operator) ont été recrutés grâce à la base de données de Liphatech et leurs délégués commerciaux. Chaque PCO a reçu un kit contenant des eppendorfs 1,5 ml, des lames de scalpel et de l'éthanol 70% permettant d'effectuer un prélèvement de tissus d'un rongeur et son stockage pour une courte durée.

#### **2. Envoi des colis et réception**

Les échantillons ont été envoyés sous enveloppe kraft par la poste à l'USC 1233 rongeurs sauvages, de Vetagro-sup à Marcy l'étoile. Une fois réceptionnés, les échantillons ont été stockés à -20°C en attendant d'être utilisés.

#### **3. Extraction de l'ADN génomique**

L'ADN génomique a été extrait à partir de l'échantillon de tissus de rongeur et en utilisant le kit « Nucleo-spin Tissue extraction kit » fourni par Macherey-Nagel (Hoerd, France). Une fois extrait, l'ADNg a été conservé à -20°C.

#### **4. Amplification du gène *Vkorc1* par PCR**

L'identification des mutations éventuellement présentes dans *VKORC1* se fait par séquençage des trois exons du gène *vkorc1* et des 2000 paires de bases en amont du site d'initiation de la traduction du gène.

#### a) Rats

2µl d'ADNg ont été utilisés afin d'amplifier le gène *vkorc1* de rat, en utilisant des primers spécifiques. Afin de séquencer la totalité du gène, deux couples de primers ont été utilisés. Les séquences du premier couple de primers sont : rVKOR-S1 et rVKOR-AS1 (5'GGTTCTTCCCTCTTGTGTCTG3') et (5'GGGTCACCAAGACATGAGGTG3'), pour amplifier le gène *vkorc1* de rat du nucléotide -36 au nucléotide +1127. Les séquences du second couple de primers sont : rVKORC1-S2 et rVKORC1-AS2 (5'ACTTGGGCAAGGCTCATGTG3') et (5'AAGAGTAGGGGACAAGGTGGC3'), pour amplifier le gène *vkorc1* de rat du nucléotide 848 au nucléotide 2183.

#### b) Souris

2µl d'ADN g a été utilisé afin d'amplifier le gène *vkorc1* de souris et en utilisant des primers spécifiques. Afin de séquencer la totalité du gène, deux couples de primers ont été utilisés. Les séquences du premier couple de primers sont : sVKOR-S1 et sVKOR-AS1 (5'GATTCTTCCCTCCTGTCC3') et (5'AGACCCTGTCTCAAAACCTA3'), pour amplifier le gène *vkorc1* de souris du nucléotide -36 au nucléotide +1727. Les séquences du second couple de primers : sVKORC1-S2 et sVKORC1-AS2 sont (5'GAAAGCAGAACAACCTTAGCAGG3') et (5'AACCAACAGCAGAATGCAGCC3'), pour amplifier le gène *vkorc1* de souris du nucléotide 1252 au nucléotide 2512.

### 5. Séquençage

Les amplicons pour chaque échantillon de rat ou de souris sont séquencés par Biofidal (Vaulx-en-Velin, France) à l'aide d'amorces internes spécifiques.

Les amorces rat sont les suivantes :

Pour l'exon 1 : 5'GCC-AGA-TGA-TTT-TGG-AGT-CTG 3'

Pour l'exon 2 : 5' CCG-GAG-GCA-CCA-GGC-TGA 3'

Pour l'exon 3 : 5' GAA-TTA-TTG-AAC-AGA-TGA-GGC 3'

Les amorces souris sont les suivantes :

Pour l'exon 1 : 5' GAT-TCT-TCC-CTC-CTG-TCC 3'

Pour l'exon 2 : 5' CAT-GCC-AGG-TCA-ATG-CCC-TTT 3'

Pour l'exon 3 : 5' ACT-CTG-GGT-CCC-AAG-AAT-TAT 3'

## 6. Lecture des séquences

Les séquences sont lues en utilisant le logiciel Bioedit<sup>®</sup> afin de vérifier les séquences ainsi que l'état génotypique. Les mutations sont détectées en comparant les séquences reçues aux séquences de référence de *Mus musculus domesticus*, de *Rattus norvegicus* et de *Rattus rattus* en utilisant le logiciel CLC Sequence viewer7<sup>®</sup>.

## 7. Résultats

Les mutations retrouvées pour chaque échantillon sont rentrées sur une base de données où sont précisés le lieu du prélèvement, l'historique des traitements effectués ainsi que le nom du PCO et son adresse. Ensuite, un rapport est envoyé au PCO pour chaque échantillon qu'il nous a fait parvenir. Dans ce rapport est précisé la mutation retrouvée, l'état génotypique et des préconisations, basées sur nos études, sur la molécule la plus efficace afin de gérer les populations de rongeurs avec la mutation trouvée.

## 8. Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Les ARN totaux ont été extraits à partir de tissus de foie : l'extraction se fait dans un premier temps dans du TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) puis en utilisant le kit SV Total RNA Isolation System de Promega (Charbonnières, France). La concentration et la pureté des ARN sont déterminées grâce à un spectromètre (UV-160A, Shimadzu, Roucaire, France) mesurant à 260 nm et 280 nm. Les ADN complémentaires ont été synthétisés à partir de 100 ng d'ARN total dans un volume final de 20 µL contenant 500 pmol d'oligo(dT) et de 200 U d'une reverse transcriptase (MMLV, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selon les instructions du fournisseur.

## 9. PCR quantitative temps réel

Les PCR temps réel ont été réalisées avec le thermocycleur MX3000P de Stratagène (Amsterdam, Pays-Bas) en utilisant des amorces spécifiques pour la détection de *Vkorc1*, *Vkorc111*, *Ggcx* et *Nqo1*. Le gène *Gapdh* a été utilisé comme gène de ménage et amplifié dans les mêmes conditions que celles instaurées pour les différents gènes cibles.

Dans un volume de 20 µl, 1 ng d'ADNc et 200 nM de chaque amorce sont ajoutés à un mix réactionnel contenant du 5X HOT BIOAmp Evagreen<sup>®</sup> qPCR Mix (Biofidal, Vaux-en-Velin, France) autorisant une amplification optimale de l'ADN. Cette amplification commence par

l'activation de la HOT BIOAmp<sup>®</sup> DNA Polymerase à 95°C pendant 15 min. Suivent ensuite 40 cycles d'amplification (30 sec à 95°C – 40 sec à 60°C – 30 sec à 72°C). La spécificité de l'amplification est vérifiée après les 40 cycles grâce à la courbe de dissociation tracée en augmentant la température à un rythme régulier (de 0,01°C par seconde de 60°C à 95°C). Dans ces conditions, l'efficacité des amplifications des gènes de *Vkorc1* et de *Vkorc111* sont similaires (101% et 99%, respectivement), ce qui permet de comparer leur expression relative. Pour chaque échantillon, le Ct (correspondant au nombre minimal de cycles à partir desquels on obtient un maximum d'intensité franchissant le seuil défini) est déterminé en duplicat dont nous allons calculer la moyenne. La détermination de la quantité du gène cible présent dans chaque tissu est normalisée en lui soustrayant le Ct du gène de ménage ( $\Delta Ct = Ct \text{ cible} - Ct \text{ ménage}$ ) et sa concentration relative est déterminée grâce à la formule suivante :  $2^{-\Delta Ct}$ .

## **B. Etude « in vitro »**

Afin de caractériser les propriétés catalytiques des enzymes VKORC1 de rat et de souris et de déterminer les conséquences de ces mutations (les mutations de VKORC1 détectées dans la bibliographie et celles identifiées au cours de cette étude) sur le fonctionnement de l'enzyme, les protéines recombinantes ont été exprimés dans la levure méthylothrophique *Pichia pastoris*. Ce système permet un fort taux d'expression de la protéine d'intérêt en présence de méthanol. La levure *Pichia pastoris* possède la capacité d'utiliser le méthanol comme seule source carbonée via l'alcool oxydase (AOX1), première enzyme de la voie de métabolisation du méthanol chez *Pichia pastoris*. Son expression est contrôlée par le promoteur du gène *Aox1*, fortement et exclusivement inductible par le méthanol. Les ADNc codant les protéines d'intérêt sont placés sous le contrôle de ce promoteur.

### **1. Construction plasmidique**

L'ensemble des constructions plasmidiques a été réalisé sur le même schéma. Les séquences nucléotidiques de *vkorc1* ont tout d'abord été optimisées par Genscript (Piscataway, NJ, USA) pour favoriser l'expression de la protéine correspondante en *Pichia Pastoris*. Les séquences nucléotidiques ainsi optimisées, additionnées en 5' d'un site EcoRI et en 3' d'une séquence codant la séquence protéique GGSGGSGGSEQKLISEEDL (permettant l'addition d'un épitope c-myc (en gras) séparé de la protéine par un linker) suivie du site XbaI ont été

synthétisées par Genscript. Ces séquences ont ensuite été sous-clonées dans les sites de restriction EcoRI et XbaI du vecteur pPICZB pour produire les vecteurs, pPICZ-mVKORC1.

## 2. Mutagenèse dirigée

Les mutants mVKORC1 ont été produits par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide du kit de mutagenèse dirigée. Une paire de primers reverses et complémentaires comportant en leur milieu la mutation souhaitée est utilisée, ainsi que la matrice plasmidique non mutée. Les cycles de PCR (dénaturation, hybridation, élongation) sont réalisés dans un appareil de PCR Mastercycler (Eppendorf, Le Pecq, France) selon les recommandations du fournisseur. A l'issue de la réaction, la matrice non mutée comportant des nucléotides méthylés est digérée par l'enzyme de restriction DpnI qui clive spécifiquement les sites méthylés pendant 2 h à 37°C. La matrice néoformée est utilisée pour transformer les bactéries compétentes.

## 3. Transformation en bactérie

Des bactéries compétentes (Stellar) ont été décongelées et mises au contact de l'ADN plasmidique pendant 5 min dans la glace. Les cellules sont soumises ensuite à un choc thermique en les plaçant à 42°C pendant 40 secondes puis 5 min dans la glace. Les bactéries sont ensuite mises en suspension dans du milieu SOC (Ozyme) à 37°C durant 20 min avant d'être étalées sur un milieu LB-Agar, contenant 100 µg/ml de zéocine et incubées pendant 1 nuit dans une étuve à 37°C. Trois ou quatre colonies résistantes sont mises en culture dans un milieu LB contenant 100 µg/mL de zéocine. L'ADN plasmidique est ensuite extrait à partir de ces cultures au moyen du kit QIAprep® Spin-miniprep pour la mini-préparation et du kit QIAGEN® plasmid midi pour la midi-préparation selon les indications du fournisseur. La séquence des plasmides obtenus est alors vérifiée par séquençage à l'aide de l'amorce AOX-sens par Biofidal (Vaulx-en-Velin, France).

## 4. Transformation en levures compétentes

La transformation des levures consiste en l'intégration du gène d'intérêt dans le génome de la levure par recombinaison au niveau de la séquence 3'-AOX (figure 40).

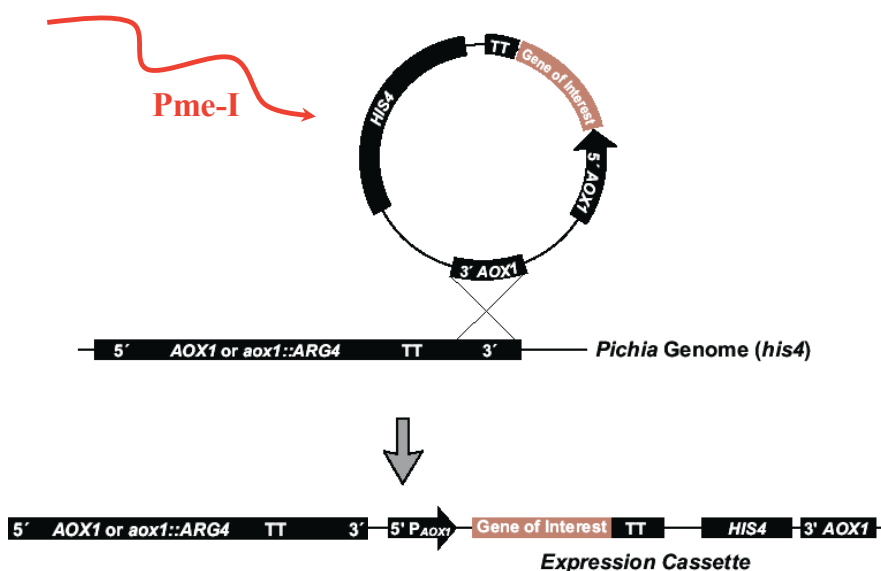


Figure 40 : Principe de la transformation des levures *Pichia pastoris*

Les levures compétentes sont transformées grâce au kit de transformation Pichia EasyComp™ (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les cellules sont mises au contact de l'ADN plasmidique préalablement linéarisé par l'enzyme de restriction *PmeI* dans un tampon contenant du polyéthylène glycol pendant 2 h à 30°C. La transformation est réalisée en faisant subir un choc thermique aux levures en les plaçant à 42°C pendant 10 min. Les levures sont ensuite mises en suspension dans du milieu YPD (1 % (p/v) extrait de levure, 2 % (p/v) peptone, 2 % (p/v) D-glucose) et placées sous agitation à 30°C pendant 3 h, puis elles sont collectées et re-suspendues dans une solution saline. Les cellules sont étalées sur un milieu YPD-Agar (2 % (p/v) Agar) contenant 100 µg/mL de zéocine (Invitrogen) et incubées pendant 2 à 3 jours dans une étuve à 30°C. Trois ou quatre colonies résistantes sont mises en culture dans le milieu YPD comme décrit ci-dessus.

##### 5. Expression des protéines recombinantes par culture de levure

La production de la VKORC1 se déroule en deux phases, une phase de croissance des levures utilisant le glycérol comme source carbonée et une phase d'induction du promoteur AOX1 où le glycérol est remplacé par du méthanol comme source de carbone.

Les levures sont cultivées dans du milieu BMGY constitué de 1 % (p/v) d'extrait de levure, de 2 % (p/v) de peptone, de 0,1 M de phosphate (pH 6,0), de 1 % (v/v) de glycérol et de 1,34 % (p/v) de Yeast Nitrogen Base (YNB) pendant environ 48 h sous agitation à 30 °C en ajoutant 2% de glycérol toutes les 4 h.

Les levures en croissance exponentielle (densité optique à 600 nm  $\geq 6$ ) sont centrifugées à 3000 g pendant 10 min à 4°C, puis elles sont reprises dans le milieu d'induction BMMY (milieu de culture dans lequel le méthanol remplace le glycérol). Les levures sont remises sous agitation à 30°C et la production de la protéine d'intérêt est induite par ajout de méthanol (1 % (v/v)) 3 fois par jour (matin, midi et soir). Après 48 h d'induction, les levures sont collectées par centrifugation avant la préparation des fractions membranaires (Figure 41).

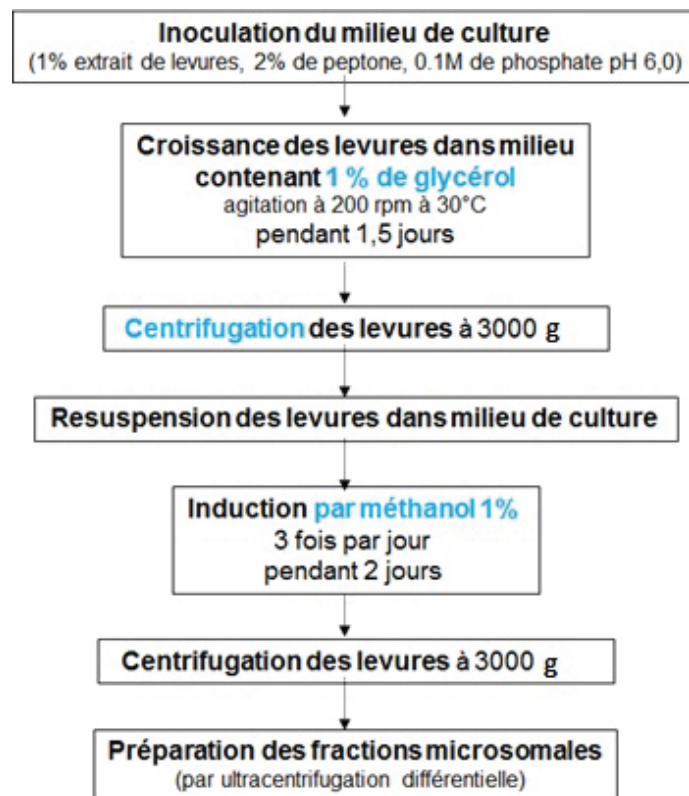


Figure 41 : Expression des protéines recombinantes VKORC1 par la levure *Pichia pastoris*

## 6. Récupération des fractions microsomales

Les culots de levures sont resuspendus dans un tampon de broyage 50 mM de phosphate de sodium (pH 7,4) contenant du KCl 1,15 % (w/v). Elles sont ensuite broyées par des billes de Zircon sous agitation constante à l'aide de l'agitateur Dispermat<sup>®</sup> LC30 (VMA-GETZMANN, Allemagne) pendant 30 minutes à 3500 rpm et à 4°C. Le lysat est centrifugé à 10000 g durant 10 min à 4°C, ce qui permet l'élimination des débris cellulaires, des noyaux et des mitochondries. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 100 000 g durant 1 h à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall<sup>®</sup> LYNX 6000 (Thermo Scientific, USA). Les culot, qui sont les microsomes, sont ensuite repris et homogénéisés dans un tampon 50 mM HEPES (pH



7,4), contenant du glycérol 20 % (v/v). Les microsomes sont aliquotés dans des tubes Eppendorf et conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

### 7. Dosage des résidus d'AVKs dans le foie

1g de tissu a été extrait avec de l'acétone en utilisant un ultra turrax IKA Labortechnik® (VWR International, Strasbourg, France). L'extrait a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été évaporé à 60°C sous flux d'azote. L'extrait sec a été remis en suspension dans de l'acétonitrile / hexane (50% / 50%). La phase d'hexane a été éliminée et le reste a été séché à 60°C sous flux d'azote. L'extrait sec final a été dissous dans du méthanol et les concentrations en AVKs ont été analysées par HPLC sur une colonne C-18 en phase inverse (4,6 x 150 mm, 5 µm; Waters, Milford, MA, USA), à une longueur d'onde de détection de 258, 260 et 267 nm, respectivement pour le difénacoum, la diféthialone et le brodifacoum. La colonne C-18 a été chauffée à 40°C pour le difénacoum et le brodifacoum et 30°C pour la diféthialone. Un système d'élution à gradient a été utilisée avec un débit de 1 ml / min: de 30% de méthanol / 70% d'eau (0,2% acidifiée avec du H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à 70% de méthanol / 30% d'eau durant 10 min pour le difénacoum; de 30% d'acétonitrile / 70% d'eau (acidifiée avec 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à 90% acétonitrile / 10% d'eau durant 14 min pour le brodifacoum et de 60% d'acétonitrile / 40% d'eau (acidifiée avec 0,2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à 75% d'acétonitrile / 25% eau durant 10 min pour la diféthialone.

### 8. Dosage des proteines microsomales

La quantité de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Le principe de cette méthode est basé sur la fixation du Bleu Brillant de Coomassie G-250 (réactif Bio-Rad, Bio-Rad, Hercules, CA) sur les résidus basiques des protéines entraînant une variation du maximum d'absorbance de 465 à 595 nm (effet bathochrome). L'absorbance à 595 nm va donc être proportionnelle à la quantité de colorant lié et donc à la quantité de protéines dans l'échantillon. La concentration en protéines est calculée par rapport à une gamme d'albumine sérique bovine (BSA, fraction V, Sigma) de 0 à 10 mg/ml traitée dans les mêmes conditions que les échantillons.

## 9. Western Blot

Le Western Blot est réalisé après séparation des protéines, en fonction de leur masse moléculaire, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions réductrices. Le Western Blot consiste à transférer les protéines présentes sur un gel d'électrophorèse sur une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF) qui subira ensuite divers traitements immunochimiques. Le SDS-PAGE (12%) a été réalisé selon le protocole décrit par Laemli (1970). Le transfert des protéines sur membrane PVDF a été réalisé selon le protocole décrit par Towbin *et al.* en 1979. Les protéines VKORC1 ont ensuite été détectées par immunorévélation par utilisation d'un anticorps primaire anti-c-myc.

Brièvement, après saturation de la membrane par une solution de lait 5% dilué dans un tampon PBS, la membrane a été incubée à 4°C toute une nuit avec l'anticorps primaire anti-c-myc (1/1000ème) (Ozyme). Après des rinçages successifs au PBS, la membrane a ensuite été mise en contact de l'anticorps secondaire de lapin conjugués à une peroxydase (1/5000ème) (Ozyme) pendant 1h à température ambiante. La détection terminale a été réalisée en incubant la membrane avec une solution ECL RevelBlot<sup>®</sup> Intense (Ozyme) et révélée par chimiluminescence à l'aide de l'imageur Syngene<sup>®</sup> (Ozyme).

## 10. Activité enzymatique

L'incubation standard a été effectuée dans un tampon hepes 200 mM (pH 7,4) contenant 150 mM de KCl, 1mM de dithiothréitol, en présence de 0,5 à 3 mg de protéines microsomaux contenant la protéine recombinante étudiée. La concentration de substrat, c'est-à-dire la vitamine époxyde (K1>O), était de 200 µM pour une réaction standard dans un volume final de 1 mL. Après incubation pendant 30 min à 37°C, la réaction était arrêtée par ajout de 2 mL d'isopropanol, après une centrifugation de 10 min à 3000g, 2 mL d'hexane étaient ajoutés. Après centrifugation pendant 10 min à 3000g, la phase organique était ensuite récupérée et évaporée à sec sous flux d'azote. Le résidu sec était immédiatement repris dans 200µl de méthanol.

L'analyse de la vitamine K produite a été effectuée par LC-APCI/MS/MS (6120 Quadrupole LC/MS série 6120) avec une interface APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) et le logiciel LCMS Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (validé pour l'analyse de la vitamine K1).

La séparation des produits a été réalisée par chromatographie inverse sur une colonne XTerra MS C18 (2.1mm × 50mm, 2.5µm, Waters, Milford, MA, USA) maintenue à 48°C. La séparation a été assurée en condition isocratique par utilisation d'une phase mobile méthanol 0.1%-acide acétique (96/4). Le débit était de 0.4 mL/min. Le volume injecté était de 20µl. La température du plateau de l'autosampler était réglée à 5°C et les échantillons étaient protégés de la lumière. La détection du produit a été réalisée par MS/MS avec une source APCI en mode positif. La pression du nébuliseur a été réglée à 60 psi, la température de gaz sec à 350°C, le flux de gaz sec à 5 l/min, et la température de vaporisation à 400°C. La tension du capillaire a été fixée à 4000V, et l'aiguille corona utilisée était de 10µA. La fragmentation de l'ion initial (451.4) correspondait à la vitamine K. Les critères d'identification de la vitamine K1 était le temps de rétention (3,9min) et la production du fragment 187 à partir de l'ion 451. La vitamine K époxyde correspondait à la fragmentation de l'ion initial (467.0). Le critère d'identification de la vitamine K1>O était le temps de rétention (2,9min).

La linéarité et la précision ont été testées de 25 à 2000 ng/ml (n=20). La réponse était linéaire sur toute la gamme de concentration testée avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) au-dessus de 0,99. La précision était comprise entre 80 et 120% des concentrations théoriques.

## 11. Analyse des résultats

La détermination des constantes cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  a été réalisée par mesure de l'activité après addition de concentrations croissantes de vitamine K1>O (de 0 à 200 µM). Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  ont été évaluées à l'aide du logiciel d'ajustement non linéaire, SigmaPlot 9.0 (Erkraft, Allemagne) à partir de l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = (V_{max} \times S) / (K_m + S)$$

v, représente la vitesse initiale

$K_m$ , la constante de Michaelis-Menten

S, la concentration en substrat (mM)

$V_{max}$ , la vitesse maximale de la réaction

La détermination des constantes d'inhibition  $K_i$  a été réalisée par mesure de l'activité à concentrations croissantes en vitamine K1>O (de 0 à 200 µM) en présence de concentrations variables d'inhibiteurs. Les valeurs de  $K_i$  ont été évaluées par régression non-linéaire à partir de l'équation d'inhibition non-compétitive :

$$v = [(V_{\max} / (1 + (I / K_i)))] \times (S / (K_m + S))$$

v, représente la vitesse initiale

I, la concentration d'anticoagulant (l'inhibiteur)

K<sub>m</sub>, la constante de Michalis-Menten

S, la concentration en substrat (mM),

V<sub>max</sub>, la vitesse maximale de la réaction

K<sub>i</sub>, la constante d'inhibition

## C. Expérimentation animale

### 1. Animaux

Les souris domestiques introgressées *spretus* ainsi que les souris W59G ont été capturées sur le terrain puis mises en quarantaine durant trente jours avant d'être amenées dans nos animaleries. Les souris CD1 ont été fournies par le laboratoire Charles River (L'arbresles, France) et laissées en zone d'acclimatation pendant une période minimale de cinq jours. L'eau et la nourriture étaient disponibles ad libitum. Les souris ont ensuite été utilisées dans le cadre d'introgession d'une mutation, ou de tests réglementaires de suivi de mortalité. Une fois mortes, le foie des souris a été rapidement retiré soit afin d'en extraire immédiatement les ARN totaux, soit pour en extraire les microsomes contenant les enzymes catalysant l'activité VKOR.

### 2. Création de la lignée W59G

La création d'une telle lignée repose sur l'introduction d'un allèle d'une lignée dite « donneuse » dans une lignée consanguine dite « receveuse ». Ceci est réalisé en établissant des croisements en retour ou backcross répétés entre individus porteurs de cet allèle et individus de la lignée receveuse. A chaque croisement avec la lignée receveuse, la proportion du génome des souris sauvages de la lignée donneuse est divisée par deux. Ainsi, après dix générations de backcross, la proportion de génome de l'individu donneur est en théorie de 0.1%. On sélectionne à chaque génération des souris hétérozygotes pour la mutation W59G. A la suite d'un croisement entre un individu hétérozygote W59G et un individu de la lignée porteuse, les descendants ont alors deux génotypes possibles : homozygotes non mutés ou

hétérozygotes. Par génotypage, les descendants hétérozygotes étaient sélectionnés afin de réaliser la génération suivante.

### 3. Tests réglementaires de suivi de mortalité

Avant l'essai, tous les animaux ont été maintenus sous alimentation A04 de chez SAFE (Augy, France) et de l'eau *ad libitum*. Les individus ont été pesés avant le début du test. Des tests sans possibilités de choix d'alimentation ont été effectués sur des groupes de dix souris. Les souris ont été nourries avec des appâts sous forme de pâte contenant soit 0,0025% de diféthialone, 0,005% de brodifacoum, 0,005% de difénacoum, 0,005% de flocoumafen, 0,005%, de chlorphacinone 0,005% de bromadiolone, ou 0,0375% de coumatétralyl. La période d'alimentation était de cinq jours pour les mâles et les femelles. Le contenu des pots de nourriture a été pesé tous les jours et la consommation d'appâts a été relevée. La mortalité des souris a également été observée quotidiennement. A la fin de la période d'alimentation avec des appâts toxiques, les souris ont reçu le régime alimentaire des animaux A04 à nouveau et elles ont été mises en observation durant une période supplémentaire de dix-sept jours. Le critère pour la résistance était la survie sur une période de vingt et un jours.

## Partie 6 : Résultats

---

### I. Caractérisation de l'implication des SNPs de *vkorc1* souris découverts lors du projet Ratail dans la résistance aux AVKs

#### A. Objectifs

Le projet Ratail nous a permis de découvrir 18 VKORC1 mutées chez la souris domestique. Nous avons déterminé leurs propriétés vis-à-vis de 3 AVKs de première génération et de 3 AVKs de seconde génération. Puis en les comparant à la VKORC1 WT nous avons déterminé les facteurs de résistance pour chacune des VKORC1 mutées et par chacun des AVKs utilisés. Ainsi, connaître les facteurs de résistance pour chaque AVK devrait permettre de mieux choisir quelle molécule utiliser en fonction de la mutation rencontrée.

#### B. Méthodes

Après extraction de l'ADNg des échantillons de souris, l'identification des SNPs présents sur le gène *vkorc1* s'est faite par séquençage des 3 exons du gène. Les VKORC1 mutées ont ensuite été exprimées en levure *Pichia pastoris*. Leur réponse aux AVKs a été évaluée par détermination des Ki vis-à-vis du coumatétralyl, de la chlorophacinone, de la bromadiolone, du difénacoum, du brodifacoum et de la diféthialone.

#### C. Principaux résultats

L'étude Ratail a permis de découvrir de nouvelles mutations non décrites chez la souris et également de montrer l'existence de doubles mutations sur la VKORC1 des souris. Concernant les simples mutations, L128S et Y139C sont celles qui apportent une résistance sévère aux AVKs de première génération. Les secondes générations restent quant à elles efficaces. Les autres simples mutations apportent une résistance moyenne aux AVKs de première génération. Les VKORC1 présentant deux mutations impliquent une résistance sévère aussi bien aux AVKs de première que de seconde génération.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article en soumission, présenté ci-dessous.

**Adaptative evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides**

Joffrey Goulois<sup>1,2</sup>, Véronique Lambert<sup>1</sup>, Lionel Legros<sup>2</sup>, Etienne Benoit<sup>1</sup> and Virginie Lattard<sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup> Liphatech, Bonnel, 47480 Pont du Casse, France

\*To whom correspondence should be adressed

**Key-words:** *Mus musculus domesticus*, VKORC1, mutations, anticoagulant rodenticides, selection pressure

Corresponding author

Dr Virginie Lattard

USC 1233 INRA-Vetagro Sup

69280 Marcy l'Etoile, France

Phone: +33-(0)4 78 87 27 27

Email: [virginie.lattard@vetagro-sup.fr](mailto:virginie.lattard@vetagro-sup.fr)

**Running title:** Adaptative evolution of *Vkorc1* mutations in *Mus musculus domesticus*



## **Abstract**

Anticoagulant rodenticides are commonly used to control rodent pests all over the world. They specifically inhibit VKORC1, an enzyme essential for the recycling of vitamin K, and thus prevent blood clotting and cause death by haemorrhage. Numerous mutations of *Vkorc1* gene were reported in rodents, and some lead to resistant to rodenticides phenotype.

In this study, presence and distribution of *Vkorc1* mutations were evaluated in France. 266 mice tails were received from 65 different locations. Species identification for each sample was based on mitochondrial cytochrome b sequence. The coding sequences and splice junctions of *Vkorc1* gene were amplified and sequenced to detect mutations and consequences of these mutations on the susceptibility to anticoagulant rodenticides were evaluated by expressing recombinant VKORC1 enzymes.

More than 70% of mice were found to be carrier of *Vkorc1* mutation. Among these mice, 80% were homozygous. Contrary to brown rats for whom one predominant *Vkorc1* genotype was found in France, twelve different *Vkorc1* genotypes were observed in the French house mice with high frequency. This strong diversity of genotypes was supported by a strong diversity of single mutations but also by combination of mutations by genetic recombination. The single mutation leading only to moderate to severe resistance only to first generation AVK, the preservation of the diversity of mutations in mice population is certainly associated to the management practices by using preferentially first generation AVK. The double mutations leading to resistance to all AVK, the emergence of such double mutations must be regarded as an adaptive response to the use of second generation AVK.

## Introduction

Tracks of the presence of house mice are found since the Neolithic. They are native of Asia and Middle East (Boursot *et al.* 1996) and due to their small size and their fast reproduction capacity, they quickly invaded Europe. Today, house mice are the most widespread mammals on the Earth and present in all the continents and all environments (rural, urban and insular) (Angel *et al.* 2009). *Mus musculus domesticus* figure on the list of the UICN as one of the 100 most invasive species in the world. They are responsible, with rats, for the degradation and for the destruction of numerous cereal crops. Twenty percent of the world food was reported to be consumed or contaminated by rats and mice (Indiana Department of Health). They are also carriers of many zoonotic pathogens. Moreover, they are also responsible for damages to substructures, electronic or electric networks resulting in important economic repercussions and even, in many fires.

To manage populations of rodents, chemical controls have been organized since 1950 by using antivitamin K (AVK) anticoagulant rodenticides. The intensive use of such molecules for pest control since the 1950' have selected many resistance strains of rodents. Resistance was first detected in brown rats in 1958 (Boyle 1960) and in house mice in the early 1960's (Dodsworth 1961) in the United Kingdom. Since, resistance has been reported worldwide, in many European countries, in the United States (Jackson and Kaukeinen, 1972) in Canada (Siddiq & Blaine 1982), in Japan (Tanaka *et al.* 2012), in Australia (Saunders 1978). The emergence of such resistance to anticoagulants belonging to the first generation (*i.e.*, warfarin, diphacinone, coumatetralyl, chlorophacinone) led to the development of new AVK belonging to the second generation (*i.e.*, bromadiolone, difenacoum, flocoumafen, brodifacoum and difethialone) in the 1970's and 1980's. Nevertheless, the use of such molecules, excessively persistent, exacerbated the risk of primary and secondary poisoning of non-target species (Hughes *et al.* 2013; Jacquot *et al.* 2013; Caloni *et al.* 2016). Therefore, such molecules should be use carefully.

The resistance to AVKs was proposed to be supported by two major mechanisms in rodents 1/ a metabolic resistance due to an accelerated detoxification system involving cytochrome P-450 (Sugano *et al.* 2001; Ishizuka *et al.* 2007) and 2/ a target resistance due to the inefficiency of AVKs to specifically inhibit the Vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity. This VKOR activity is involved in the recycling of vitamin K by allowing the reduction of vitamin K epoxide in vitamin K quinone. Vitamin K is necessary for the activation of clotting factors II, VII, IX and X. Inhibition of VKORC1 enzyme by AVK

molecules results in the absence of gamma-carboxylated clotting factors II, VII, IX and X and thus compromises the coagulation process.

Even if the VKOR activity was described in the 1970's, the VKORC1 enzyme catalyzing this activity was identified only in 2004 by two different teams (Li *et al.* 2004; Rost *et al.* 2004). This enzyme of 163 amino acids is coded by the *vkorc1* gene. This gene is located on the chromosome 7 in mice and on the chromosome 1 in rats. Single nucleotide polymorphisms of this gene were immediately proposed to be responsible for resistance to AVK (Rost *et al.* 2004; Pelz *et al.* 2005; Grandemange *et al.* 2009; Hodroge *et al.* 2011) (Rost *et al.*, 2004; Pelz *et al.*, 2005; Grandemange *et al.*, 2009a; Hodroge *et al.*, 2011) and appear to support the resistance process in Western Europe, even if cohabitation of target resistance and metabolic resistance had been demonstrated in Denmark (Markussen *et al.* 2007, 2008).

In this paper we describe different new mutations in the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* found in France, but also different double mutations resulting from a recombination process between mice populations carrying the corresponding single mutations. We thus analyze using recombinant VKORC1 the consequences of the mutations observed in France on the resistance to AVK. Finally, this study allows to compare the evolution pattern of *Vkorc1*-dependent resistance between humans, rats and mice.

## **Materials and Methods**

### ***Mice tissue sampling***

*Mus musculus domesticus* samples were collected from the national network of PCOs in 27 out of 95 departments (French administrative areas) covering all the country. The tails of dead mice were cut, and the samples were sent to the laboratory by mail in individual tubes with 70° alcohol. They were frozen at -20 °C until analysis. For each tail, PCO filled a questionnaire indicating the site where the mouse was trapped, the method of trapping (bait, trap or other method), the chemical method used for the last 6 months before the trapping.

### ***Vkorc1 sequencing***

Genomic DNA was extracted from tail sample using the Macherey-Nagel Nucleo-spin Tissue extraction kit (Hoerdts, France). Two µl of genomic DNA was amplified using specific primers of *Vkorc1* gene. In order to sequence the totality of the *Vkorc1* gene, two sets of primers were used. The sequences of the first set of primers sVKOR-S1 and sVKOR-AS1

were (5'-GATTCTTCCCTCCTGTCC-3') and (5'-AGACCCTGTCTCAAAACCTA-3'), respectively, and were used to amplify mouse *Vkorc1* gene from nucleotide -36 to nucleotide +1727. The sequences of the second set of primers sVKORC1-S2 and sVKORC1-AS2 were (5'-GAAAGCAGAACAACCTTAGCAGG-3') and (5'-AACCAACAGCAGAATGCAGCC-3'), respectively, and were used to amplify the mouse *Vkorc1* gene from nucleotide (+)1252 to nucleotide (+)2512. Mouse *Vkorc1* amplifications were performed using sVKOR-S1 and sVKOR-AS1 or sVKOR-S2 and sVKOR-AS2 (10 pmol), Accuprime polymerase (1 units, Invitrogen) in a 25 µl reaction volume containing 2 µl DNA, 2.5 µl 10X Accuprime buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94°C for 3 min followed by 40 cycles at 94°C for 20 s, 64°C for 20 s, 68°C for 50 s, and a final extension step at 68°C for 10 min. The amplified products were sequenced on both strands.

### ***DNA mutation screening assay***

The VKORC1 exons 1, 2 and 3 from the 250 mouse samples were sequenced (Biofidal, Lyon, France). The sequences were read with Bioedit software. They were analyzed using clc sequence viewer 7 software and compared to published *Mus musculus domesticus* sequences published in Genbank in order to detect the homozygous mutations. The heterozygous mutations were detected by examination of the sequencing chromatogram.

### ***Heterologous expression of wild type and mutated Mus musculus domesticus VKORC1***

The coding sequence corresponding to the *Mus musculus domesticus* VKORC1 fused with a c-myc tag via a flexible (GGG)<sub>3</sub> in its 3'-extremity was optimized for heterologous expression in yeast and synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA). The synthesized nucleotide sequence included EcoRI and XbaI restriction sites at its 5'- and 3'- extremities, respectively. This nucleotide sequence was subcloned into pPICZ-B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and sequenced on both strands.

Construction of mVKORC1 mutant was carried out using pPICZ-mVKORC1 as template with the Quick change site directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's recommendations. Mutant was checked by sequencing, and was thus expressed in *P. pastoris* as described by Hodroge et al (Hodroge *et al.* 2011, 2012).

### ***Subcellular fractionation of yeast cells***

Microsomes were prepared from yeast cells by differential centrifugation. Briefly, yeast cells were resuspended in 50 mM Phosphate Buffer (pH 7.4) containing 1.15 % (w/v) of KCl. They were broken with Zircon beads using Dispermat® LC30 (VMA- GETZMANN, Germany) (30 min – 3500 rpm) continuously at 4 °C and further submitted to differential centrifugation continuously at 4°C. The 100,000 g pellet corresponding to the membrane fraction was resuspended by Potter homogenization in HEPES glycerol buffer (50 mM Hepes, 20% glycerol, pH 7.4). Protein concentrations were evaluated by the method of Bradford using bovin serum albumin as a standard. Microsomes were frozen at -80°C and used for kinetic analysis.

### ***Vitamin K epoxide reductase activity (VKOR) assays and kinetics***

Microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity was assayed as described previously (4, 15). Briefly, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl, 1 mM dithiothreitol and 1 g.L<sup>-1</sup> of total proteins. The reaction was started by the addition of vit K<sub>1</sub>>O solution in 1% Triton X-100 and incubated at 37°C for 30 min. In these conditions, the reaction was linear according to the time of incubation and the quantity of incubated proteins. After incubation at 37°C for 30 min, the reaction was stopped by adding of 2 mL of isopropanol. After centrifugation at 3000 g for 10 min in order to precipitate proteins, 2 mL of hexane was added. After centrifugation at 3000 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.

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 (2.1mm × 50mm, 2.5µm, Waters, Milford, MA, USA) with a mobile phase of methanol, 0.1% acetic acid (96:4) in isocratic condition. The column temperature was 48°C. The flow rate in the LC column was 0.4ml/min. The injection volume was 20µl. 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 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 for vit  $K_1$  are the retention time ( $t_r= 3.9$  min) and the selected ion 451.4. Identification criteria for vit  $K_1>O$  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.

$K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_i$  values were obtained from at least three separate experiments performed on two different batches of protein. The estimation of  $K_m$  and  $V_{max}$  values was achieved by the incubation of at least 9 different concentrations of vit  $K>O$  (from 0.003 to 0.2 mM) to the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis-Menten model using the R-fit program. In order to evaluate the inhibiting effect of AVKs on VKOR activity,  $K_i$  were determined after addition of various concentrations of anticoagulant (Fig. 3) to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vit  $K>O$  (from 0.003 to 0.2 mM) using anticoagulant concentrations from about 0.05 to  $20 \times K_i$ . Data were fitted by non-linear regression to the non-competitive inhibition model  $v= (V_{max}/(1+(I/K_i))) \cdot (S/(K_m+S))$  using the R-fit program.

## Results

### *Genotyping results*

A total of 266 tail samples were sent by PCO from 27 administrative departments indicated by their respective administrative number in Figure 2. Sampling was performed in 65 different locations. Species identification for each sample was based on mitochondrial cytochrome b sequence. For all the samples, amplified sequences presented more than 98% of homology with sequences of *cytochrome b* published for *Mus musculus domesticus*.

To identify mutations in the *Vkorc1* gene of the 266 mice, the coding sequences and splice junctions of *Vkorc1* gene were amplified and sequenced. Obtained sequences were compared subsequently to published *Vkorc1* sequences for *Mus musculus domesticus* (Genbank accession number GQ905715) and for *Mus spretus* (Genbank accession number GQ905711). Only 73 samples presented no missense mutation in the coding sequences of *Vkorc1* gene (i.e., 27.4% of the mice tails sent by PCO). 193 samples presented at least one missense mutation in the coding sequences of *Vkorc1* gene (i.e., 72.6% of the mice tails sent by PCO). From the 193 French mice carriers for *Vkorc1* missense mutations, 80% were homozygous and only 20% were heterozygous.

Ten different mutations were found in the *Vkorc1* gene in the French mice. The descriptions of the mutations found in the *Vkorc1* gene are summarized in Table 1. In exon 1, 5 mutations were detected. These mutations were located at nucleotide 34 (g.34C>T), 76 (g.76G>T or g.76G>A), 111 (g.111A>G) and 142 (g.142G>C). Except for the g.111A>G mutation, these mutations were missense mutations leading to mutations R12W, A26S, A26T and A48T, respectively. In exon 2, 2 mutations were detected. These mutations were located at nucleotide 969 (g.969T>G) and nucleotide 976 (g.976G>T) and led to mutations W59G and R61L, respectively. The W59G was detected only at the homozygous state. In exon 3, 3 mutations were detected at nucleotide 2177 (g.2177C>A), 2190 (g.2190T>C) and 2223 (g.2223A>G) and led to mutations L124M, L128S and Y139C, respectively.

Twelve *Vkorc1* genotype were observed in the French mice. Six *Vkorc1* genotypes detected in the French mice led to a single mutation in the corresponding VKORC1 protein (i.e., A26T, A26S, W59G, L124M, L128S or Y139C). The locations of these genotypes are presented in Figure 2. The observed allelic frequencies of A26T, A26S, W59G, L124M, L128S and Y139C in our sampling, were, respectively, 1.3%, 0.4%, 1.1%, 3.4%, 14.9% and 12.3%. The allelic frequencies of these mutations were different between geographical areas. The results are summarized in table 2 with the number of samples and the number of mutated samples. The departments were gathered according to 5 geographical areas (i.e., Brittany, North, Marne, South West and South East) presented in figure 2. The other genotypes led to VKORC1 with two or more mutations. The combination of R12W, A26S, and A48T in exon 1 associated to the R61L mutation in exon 2 were previously described as the *Vkorc1*<sup>SPF</sup> genotype. However, other mutations were found to be present on the same allele of *Vkorc1*. The g.969T>G mutation was found to be associated with the g.2177C>A mutation or the g.2190T>C mutation at the homozygous state leading to proteins with two combined mutations, the W59G and L124M or the W59G and L128S. The allelic frequencies of these two genotypes in our sampling were, respectively, 2.3% and 0.4% in France. The association of the g.969T>G mutation with the g.2177C>A mutation was only found in Brittany (Table 2 and Figure 2) and the association of the g.969T>G mutation with the g.2190T>C mutation was only found in Marne (Table 2 and Figure 2). The g.76G>T mutation was found to be associated with the g.976G>T mutation or the g.2190T>C mutation at the homozygous state leading to proteins with two combined mutations, the A26S and R61L or the A26S and L128S. The observed allelic frequencies of these two genotypes in our sampling were, respectively, 0.4% and 0.8% in France. Both genotype were found in the North of France (Table 2 and Figure 2). The g.76G>A mutation was found to be associated with the



g.2190T>C mutation at the homozygous state leading to a protein with two combined mutations, the A26T and L128S. The allelic frequency of this genotype in our sampling was 5.3% and this genotype was detected only in the North of France.

### ***Functional consequences of VKORC1 mutations***

To assess the consequences of VKORC1 mutations on the functional properties of VKORC1, wild type VKORC1 and its mutants were overexpressed as c-myc-fused proteins in *P. pastoris*. All the French single and double mutants, but also, mutants detected in other countries in previous studies, were characterized in this study. All proteins were efficiently expressed in *P. pastoris* with the same expected molecular mass of approximately 20-kDa. The ability of each membrane protein to catalyze the reduction of K>O to K was determined. Five single or double mutants (i.e., W59G, W59L, W59S, W59G/L124L and W59G/L128S) presented less than 2% of the VKOR activity determined for wild type VKORC1 preventing additional studies (Table 3). The other mutants were all able to reduce the vitamin K epoxide with  $K_m$  similar to wild type VKORC1 (Table 3).

In order to compare the susceptibilities to AVKs of wild type VKORC1 and its mutants, their respective inhibition constants  $K_i$  towards various AVKs of the first generation (i.e., coumatetralyl, chlorophacinone) or the second generation (i.e., bromadiolone, difencoum, difethialone or brodifacoum) were determined. All AVKs were able to inhibit the VKOR activity in a non-competitive manner for all the mutants. Nevertheless, the concentrations of AVKs necessary to inhibit the VKOR activity was different between mutants and between inhibitors. Results are presented in Figure 3 as a ratio between the  $K_i$  obtained for the mutated protein and the  $K_i$  obtained for the wild type protein, this ratio representing the resistance factor of the mutated protein.

### **Discussion**

Numerous mutations of the *Vkorc1* gene have been detected in house mice, in France in this study, but also in other European countries in previous studies. In order to characterize the consequences of the emergence of these mutations on the chemical control of mice carriers for these mutations, the wild type and mutated VKORC1 proteins were expressed in *Pichia pastoris* and their catalytic properties were determined. Resistance factors corresponding to the ratio between  $K_i$  obtained for the mutated VKORC1 and for the wild type VKORC1 were determined for each VKORC1 protein towards each anticoagulant



rodenticide. These *in vitro* resistance factors used for the first time to study the consequences of the *Vkorc1* mutations in brown rats (Hodroge *et al.* 2011) were shown to be totally coherent with resistance factors obtained using liver microsomes (Lasseur *et al.* 2005) and with resistance factors obtained *in vivo* using strains of rats homozygous for wild-type VKORC1 or VKORC1-Y139F (Grandemange *et al.* 2009). Therefore, in this study, the resistance factors determined *in vitro* by using recombinant VKORC1 expressed in yeasts are considered as good markers of the *in vivo* resistance phenotype of rodents, for whom we possessed only fragments of tail.

In house mice, 15 mutations of the *Vkorc1* gene have been detected in Europe (Pelz *et al.* 2005, 2012; Grandemange *et al.* 2010); 11 mutations in Germany and 9 mutations in France with 6 common mutations between studies. The genetic variation of the *Vkorc1* gene of mice in term of number of mutations seems to be similar to that described in humans and rats. Indeed, mutations of the *Vkorc1* gene have been particularly analyzed in humans because of the massive therapeutic use of AVK worldwide in human with almost 22 million of patients receiving daily AVK and because of the wide variability of dosage necessary to achieve stable anticoagulation between patients. This variability being partly due to genetic polymorphisms in the *Vkorc1* gene, numerous studies have been performed to detect new *Vkorc1* mutations in patients resistant to AVK. These studies allowed to detect in humans 27 mutations in the coding sequence of the *Vkorc1* gene (Rost *et al.* 2004; D'Andrea *et al.* 2005; Rieder *et al.* 2005; Bodin *et al.* 2005, 2008; Osman *et al.* 2006; Loebstein *et al.* 2007; Wilms *et al.* 2008; Harrington *et al.* 2008, 2011; Peoc'h *et al.* 2009; Schmeits *et al.* 2010; Watzka *et al.* 2011; Rishavy *et al.* 2011). In rats, 15 missense mutations in the *Vkorc1* gene of *Rattus norvegicus* have been described in Europe (Rost *et al.* 2004; Pelz *et al.* 2005, 2012; Grandemange *et al.* 2010; Haniza *et al.* 2015). The number of mutations found in this gene is thus comparable between rats, mice and humans. Therefore, the existence of such a diversity of *Vkorc1* mutations cannot be associated with the intensive use of AVK molecules. This diversity of mutations is generated in rats and humans by spontaneous mutations, while in house mice this diversity is generated by spontaneous mutations for A26T, E37G, R48G, L124Q, L124M, L128S, Y139C, but also by introgression in the genome of *Mus musculus domesticus* of the *Vkorc1* gene of *Mus spretus* for R12W, A26S, A48T and R61L (Song *et al.* 2011; Liu *et al.* 2015).

Contrary to the number of mutations observed which is similar between species, allelic frequencies of mutations in the *Vkorc1* gene are tremendously different between these three species. Indeed, in humans, none of these mutations exceeds 1% of allelic frequency, while in

rats some mutations can reach 100% of allelic frequency in some geographical areas (Berny *et al.* 2014) . The difference in the evolution of the allelic frequencies of the *Vkorc1* mutations between species is certainly linked to the use of AVK, to the level of resistance conferred by mutations and to the population structure. In humans, the allelic frequencies of *Vkorc1* mutations are well below 1% and the resistance level to AVK conferred by all the mutations are limited compared to that conferred by some *Vkorc1* mutations in rats. The use of warfarin or other AVK in humans cannot be considered as a selection pressure since the average age of patients treated with AVK is around 70 years and therefore *Vkorc1* mutations in humans, even if this mutation leads to resistance to AVK, can be considered as neutral. In rats, if 15 *Vkorc1* mutations have been reported in Europe, 3 mutations only are frequently and mostly observed in Europe. In France and Belgium, the major mutation observed in the *Vkorc1* gene of brown rats is the Y139F mutation (Grandemange *et al.* 2010; Baert *et al.* 2012), in Germany, Netherland and Denmark, it is the Y139C mutation (Pelz *et al.* 2005, 2012; Meerburg *et al.* 2014) (Pelz *et al.*, 2005; Pelz *et al.*, 2009, Meerburg *et al.*, 2014), and in England, it is the Y139C and less frequently, the L120Q mutation (Buckle 2013; Haniza *et al.* 2015). Inside their respective geographical areas of distribution, their allelic frequency can be very high. In France, the observed allelic frequency of the Y139F mutation was reported in 2010 to be 21% from a sampling of 268 rats trapped from 91 sites well distributed in France (Grandemange *et al.* 2010), while the other mutations found in France (i.e., Y139C, L128Q, L120Q, E155K, S103Y) accounted for only 6.5% of the *Vkorc1* alleles analyzed. The repetition of this resistance monitoring conducted between 2014 and 2015 by our laboratory suggests an increase in the allelic frequency of the Y139F in France since 2010 with an observed allelic frequency that has now reached over 50% in a population of 126 rats trapped from 18 French administrative departments (results not shown). Moreover, this allelic frequency can reach locally in rural areas levels close to 80% (Berny *et al.* 2014) with many individuals carrier for this mutation in the homozygous state. This high frequency of homozygous individuals is related to the structure populations with populations of very small size allowing to generate homozygous individuals. In Germany, Netherland and England, the predominance of one mutation in brown rats populations seems also to be the case with the Y139C mutation widely distributed with frequencies similar to that observed in France for the Y139F mutation (Pelz 2007; Meerburg *et al.* 2014; Haniza *et al.* 2015). Nevertheless, as described for France, in all the geographical areas, other *Vkorc1* mutations can be detected, but with allelic frequency very low even inside the geographical areas where they were detected. Contrary to humans, the frequency of the *Vkorc1* mutations in brown rats is linked to the selection pressure due the

intensive use of AVK to control rat populations. The Y139F, Y139C and L120Q *Vkorc1* mutations confer such a benefit in the field for brown rats carrier for one of this mutations compared to other rats, that they have become widely predominant leading to the almost disappearance of other *vkorc1* mutations. Indeed, the Y139F, Y139C and L120Q mutations lead to drastic resistance to AVK of the first generation such as chlorophacinone, coumatetralyl, but also to some AVK of the second generation such as bromadiolone and to a lesser extent difenacoum. During pest control management with one of these molecules, only the brown rats carrier for one of these mutations, in the homozygous state and also, but to a lesser extent, in the heterozygous state, survive. Fortunately, brown rats carrier for one of these mutations are still susceptible to AVK such as difethialone, brodifacoum, and flocoumafen and control with one of these molecules is still possible.

In mice, 15 mutations have been detected in Europe in this study and in a previous study performed in 2012 (Pelz *et al.* 2012). Frequency of mice carriers for *Vkorc1* mutations was found to be extremely elevated in both studies. In the previous study performed in Germany, Switzerland and Azores, 80% of mice trapped from 30 sites were found to be carrier of one mutation in the *Vkorc1* gene. Only 1 site was described to be free of mice carrier for *Vkorc1* mutations. In this study, more than 70% of mice trapped from 65 sites were found to be carrier at least of one mutation in the *Vkorc1* gene. Only 5 sites were found to be free of mice carrier for *Vkorc1* mutations. Among the mice carrier for *Vkorc1* mutations, 80% were homozygous. The results obtained in France are thus very similar to the results reported for Germany. The frequency of mice carrier for *Vkorc1* mutation seems thus more elevated than that in brown rats populations (*i.e.*, reported to be 35% in France in 2010). In France, 9 different *Vkorc1* mutations are observed in house mice that are either spontaneous mutation or mutations due to introgression of the *Vkorc1* gene from *Mus spretus* in the genome of *Mus musculus domesticus*. All these mutations can be observed in the homozygous state which demonstrates that very high allelic frequencies can be reached locally for all of them. Contrary to the brown rat populations, no predominant mutation is observed in the French mice suggesting a different evolution of the distribution of the *Vkorc1* mutations in mice compared to brown rats.

The study of resistance factors associated with each *Vkorc1* mutations performed using recombinant VKORC1 enzymes allowed us to give additional information to better understand this different evolution. Among the *Vkorc1* mutations detected in mice, some mutations (*i.e.*, A26T, E37G, R58G, L124M and L124Q) lead to a moderate resistance to first generation AVK such as chlorophacinone and coumatetralyl with resistance factors of about

5; second generation molecules remaining still efficient. Such resistance factors allow certainly mice homozygous for one of these mutations to survive when pest control is done using first generation AVK. On the contrary, the use of second generation AVK will kill such mice. The other *Vkorc1* mutations observed in mice such as L128S, Y139C or the *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype lead to a severe resistance to first generation AVK, but also to some second generation AVK. If 9 mutations are observed in mice with high frequencies contrary to brown rats for whom only 1 mutation is observed with high frequency, it is certainly due to a difference in the selection pressure exerted by AVK. Until the 2000s, the most widely AVK used to control house mice were first generation AVK because of the lower toxicity and the lower persistence of such molecules and because of their intensive use by non-professionals. To that extent, *Vkorc1* mutations conferring even limited resistance factors to first generation AVK have been also selected, and it is certainly the mice population management practices that have maintained the diversity of *Vkorc1* mutations in mice.

Moreover, the preservation of such a diversity and the high prevalence of each of these mutations in the homozygous state are responsible for the emergence of double mutants (*i.e.*, A26T/L128S, A26S/L128S, W59G/L124M, W59G/L128S) due certainly, to genetic recombination between mutated alleles. Indeed, in the geographical areas where double mutations on the same *Vkorc1* allele were observed, mice carrying the corresponding single mutations in the homozygous state were systematically present. For example in Brittany, mice homozygous for the mutation W59G, mice homozygous for the mutation L124M and mice homozygous for the double mutations W59G / L124M are found and within the same site of capture, the 3 types of genome were also encountered. In the North of France, mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype, mice homozygous for A26S/R61L mutations and mice homozygous for A26S/L128S mutations are found. It is surprising to find the A26S mutation not associated with the R12W and the A48T mutation, and even sometimes with the R61L mutation, because all these mutations were introduced together in the genome of *Mus musculus domesticus* from the genome of *Mus spretus* by introgression of the *Vkorc1* gene. The single mutations A26S, or even the double mutations A26S/R61L, probably occurred through a non-crossover (NCO) gene conversion which is a mechanism with strong frequency at a rate of  $6 \times 10^{-6}$ /bp/generation compared to crossover gene conversion (Williams *et al.* 2015).

The emergence of the double mutations (A26T/L128S, A26S/L128S) confer an evident benefit for mice carrier for these double mutations compared to mice carrier for the corresponding single mutations (Fig. 4). While the single A26T, A26S or L128S mutations

lead to moderate resistance to first generation AVK, the double mutations lead to resistance to all AVK currently available with resistance factors reaching levels higher than 10 towards difenacoum and brodifacoum and close to 10 towards difethialone for A26T/L128S. Such levels of resistance towards such molecules are never found for any of the isolated mutations observed in mice, but also in brown rats. The emergence of these double mutations must therefore be regarded as an adaptive response to the use of AVKs. Interestingly, the observation of mice heterozygous for A26T and Y139C or L128S and Y139C on different alleles can be seen as a necessary step prior to the recombination that has not yet been demonstrated in mice but whose consequences would be certainly important. Indeed, such double mutations on the same allele would confer levels of resistance as observed with the A26T/L128S double mutations (Fig.4).

In this adaptive context, the use of the first generation AVK for the management of the mice populations should have been avoided and the most powerful second generation AVK such as difethialone, brodifacoum or flocoumafen must be preferred. Nevertheless, the observation in the field of mice already presenting moderate resistance to the most powerful AVK is worrying for the future control of the mice population unless the double mutations in the *Vkorc1* gene are associated with an important biological cost. In brown rats, new spontaneous mutations in the *Vkorc1* gene would be required to acquire resistance to these molecules since combination of mutations seems unlikely due to the population structure and the small number of mutations encountered and the predominance of one mutation per geographical area.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grant ISI n°I1301001W “NEORAMUS” from Bpi France. We want to thank all the PCO who sent us tails of mice.

### **References**

- Angel A, Wanless RM, Cooper J (2009) Review of impacts of the introduced house mouse on islands in the Southern Ocean: are mice equivalent to rats? *Biological Invasions*, **11**, 1743–1754.
- Baert K, Stuyck J, Breyne P, Maes D, Casaer J (2012) Distribution of anticoagulant resistance in the brown rat in Belgium. , **142**, 39–48.

- Berny P, Fourel I, Lattard V (2014) Anticoagulant rodenticides: resistance and residues in Norway rats in France. In: pp. 342–346. *Vertebr Pest Conf.*
- Bodin L, Horellou MH, Flaujac C, Lorient MA, Samama MM (2005) A vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with vitamin K antagonist resistance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **3**, 1533–1535.
- Bodin L, Perdu J, Diry M, Horellou M-H, Lorient M-A (2008) Multiple genetic alterations in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene (VKORC1) can explain the high dose requirement during oral anticoagulation in humans. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**, 1436–1439.
- Boursot P, Din W, Anand R *et al.* (1996) Origin and radiation of the house mouse: mitochondrial DNA phylogeny. *Journal of Evolutionary Biology*, **9**, 391–415.
- Boyle CM (1960) Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons. *Nature*, **188**, 517–517.
- Buckle A (2013) Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Pest Management Science*, **69**, 334–341.
- Caloni F, Cortinovis C, Rivolta M, Davanzo F (2016) Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *The Science of the Total Environment*, **539**, 331–336.
- D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Perna PD *et al.* (2005) A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*, **105**, 645–649.
- Dodsworth E (1961) Mice are spreading despite such poisons as warfarin.
- Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R *et al.* (2009) Consequences of the Y139F *Vkorc1* mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenetics and genomics*, **19**, 742–750.
- 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 Management Science*, **66**, 270–276.
- Haniza MZH, Adams S, Jones EP *et al.* (2015) Large-scale structure of brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in England: effects on rodenticide resistance. *PeerJ*, **3**, e1458.
- Harrington DJ, Gorska R, Wheeler R *et al.* (2008) Pharmacodynamic resistance to warfarin is associated with nucleotide substitutions in VKORC1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**, 1663–1670.



- Harrington DJ, Siddiq S, Allford SL, Shearer MJ, Mumford AD (2011) More on: endoplasmic reticulum loop VKORC1 substitutions cause warfarin resistance but do not diminish gamma-carboxylation of the vitamin K-dependent coagulation factors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **9**, 1093–1095.
- 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **515**, 14–20.
- Hodroge A, Matagrín B, Moreau C *et al.* (2012) VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, **10**, 2535–2543.
- Hughes J, Sharp E, Taylor MJ, Melton L, Hartley G (2013) Monitoring agricultural rodenticide use and secondary exposure of raptors in Scotland. *Ecotoxicology (London, England)*, **22**, 974–984.
- Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T *et al.* (2007) Elevated Warfarin Metabolism in Warfarin-Resistant Roof Rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**, 62–66.
- Jacquot M, Coeurdassier M, Couval G *et al.* (2013) Using long-term monitoring of red fox populations to assess changes in rodent control practices. *Journal of Applied Ecology*, **50**, 1406–1414.
- Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B *et al.* (2005) Warfarin resistance in a French strain of rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **19**, 379–385.
- Li T, Chang C-Y, Jin D-Y *et al.* (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*, **427**, 541–544.
- Liu KJ, Steinberg E, Yozzo A *et al.* (2015) Interspecific introgressive origin of genomic diversity in the house mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 196–201.
- Loebstein R, Dvoskin I, Halkin H *et al.* (2007) A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood*, **109**, 2477–2480.
- Markussen MD, 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 gamma-carboxylation. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **21**, 373–381.
- Markussen MD, 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 Management Science*, **64**, 239–248.
- Meerburg BG, van Gent-Pelzer MP, Schoelitsz B, van der Lee TA (2014) Distribution of anticoagulant rodenticide resistance in *Rattus norvegicus* in the Netherlands according to *Vkorc1* mutations. *Pest Management Science*, **70**, 1761–1766.
- Osman A, Enström C, Arbring K, Söderkvist P, Lindahl TL (2006) Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **4**, 1723–1729.
- Pelz H-J (2007) Spread of resistance to anticoagulant rodenticides in Germany. *International Journal of Pest Management*, **53**, 299–302.
- Pelz H-J, Rost S, Hünerberg M *et al.* (2005) The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*, **170**, 1839–1847.
- Pelz H-J, Rost S, Müller E *et al.* (2012) Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Management Science*, **68**, 254–259.
- Peoc'h K, Pruvot S, Gourmel C, Dit Sollier CB, Drouet L (2009) A new VKORC1 mutation leading to an isolated resistance to fluindione. *British Journal of Haematology*, **145**, 841–843.
- Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF *et al.* (2005) Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose. *New England Journal of Medicine*, **352**, 2285–2293.
- Rishavy MA, Usubalieva A, Hallgren KW, Berkner KL (2011) Novel Insight into the Mechanism of the Vitamin K Oxidoreductase (VKOR). *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 7267–7278.
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V *et al.* (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, **427**, 537–541.
- Saunders GR (1978) Resistance to warfarin in the roof rat in Sydney, NSW. *Search*, **9**, 39–40.
- Schmeits PCJ, Hermans MHA, Van Geest-Daalderop JHH *et al.* (2010) VKORC1 mutations in patients with partial resistance to phenprocoumon. *British Journal of Haematology*, **148**, 955–957.
- Siddiq Z, Blaine WD (1982) Anticoagulant resistance in house mice in Toronto, Canada. *Environmental Health Review*, **2**, 49–51.



- Song Y, Endepols S, Klemann N *et al.* (2011) Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between Old World mice. *Current biology : CB*, **21**, 1296–1301.
- Sugano S, Kobayashi T, Tanikawa T *et al.* (2001) Suppression of CYP3A2 mRNA expression in the warfarin-resistant roof rat, *Rattus rattus*: possible involvement of cytochrome P450 in the warfarin resistance mechanism. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, **31**, 399–407.
- Tanaka KD, Kawai YK, Ikenaka Y *et al.* (2012) The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **103**, 144–151.
- Watzka M, Geisen C, Bevans CG *et al.* (2011) Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **9**, 109–118.
- Williams AL, Genovese G, Dyer T *et al.* (2015) Non-crossover gene conversions show strong GC bias and unexpected clustering in humans. *eLife*, **4**.
- Wilms EB, Touw DJ, Conemans JMH, Veldkamp R, Hermans M (2008) A new VKORC1 allelic variant (p.Trp59Arg) in a patient with partial resistance to acenocoumarol and phenprocoumon. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**, 1224–1226.

**Author contributions:**

VLat and EB conceived of the study. JG and LL provided field samples. JG, VLam, VLat conducted genetic screening and sequences analyses. JG, VLat and EB wrote the manuscript.

Table 1. Detail of SNPs and mutations of Vkorc1 found in French mice

Mutation	Nucleotide position	Codon WT	Codon mut	AA WT	AA mut	Exon
R12W	34	CGG	TGG	Arg	Trp	1
A26S	76	GCA	TCA	Ala	Ser	1
A26T	76	GCA	ACA	Ala	Thr	1
E37E	111	GAA	GAG	Glu	Glu	1
A48T	142	GCC	ACC	Ala	Thr	1
W59G	969	TGG	GGG	Trp	Gly	2
R61L	976	CGG	CTG	Arg	Leu	2
L124M	2177	CTG	ATG	Leu	Met	3
L128S	2190	TTA	TCA	Leu	Ser	3
Y139C	2223	TAT	TGT	Tyr	Cys	3

Table 2. Detailed locations and frequencies of SNPs and mutations of Vkorc1 found in French mice

Area	N° of sampling sites	N° of mice	N° of mutated mice	% of mutation/ area	Mutation	HeteroZ	HomoZ	Allelic frequency
Brittany	13	31	19	61	W59G	0	2	6.5
					L124M	4	7	29
					W59+L124M	0	6	19.4
North	17	82	74	90	A26T	1	3	4.3
					L128S	7	28	38.4
					A26T+L128S	3	14	18.9
					Y139C	7	4	9.1
					Vkorc1 <sup>spr</sup>	0	7	8.5
					A26S+R61L	0	1	1.2
A26S+L128S	0	2	2.4					
Marne	1	6	5	83	W59G	0	2	33
					L128S	2	0	17
					W59G+L128S	0	1	17
South West	13	29	6	20	Y139C	1	4	15
					Vkorc1 <sup>spr</sup>	1	0	1.7
South East	21	118	89	75	A26S	0	1	0.9
					L128S	7	4	6.4
					Y139C	8	18	18.6
					Vkorc1 <sup>spr</sup>	3	50	43.6

Table 3. Apparent kinetic parameters towards vit K1>O obtained for yeast microsomes expressing wild type or mutated VKORC1

To determine the VKOR activity, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl and 0.25 to 2 g.l<sup>-1</sup> of microsomal proteins expressing membrane wild type or mutant VKORC1. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three individual determinations. Comparison between two groups was done by using Mann-Whitney test. \* p<0.05 compared to wild type VKORC1.

Mutations	Km ( $\mu$ M)
WT	28 $\pm$ 3
R12W	49 $\pm$ 29
A26S	21 $\pm$ 8
A26T	7 $\pm$ 0.5
E37G	66 $\pm$ 18
A48T	38 $\pm$ 20
R58G	45 $\pm$ 19
W59G	VKOR activity < 2% of WT
W59L	VKOR activity < 2% of WT
W59S	VKOR activity < 2% of WT
R61L	42 $\pm$ 22
L124M	11 $\pm$ 8
L124Q	20 $\pm$ 7
L128S	18 $\pm$ 5
Y139C	35 $\pm$ 1
A26T/L128S	52 $\pm$ 2.5
A26S/L128S	31 $\pm$ 4
W59G/L124M	VKOR activity < 2% of WT
W59G/L128S	VKOR activity < 2% of WT
<i>Vkorc1</i> <sup>SPT</sup>	25 $\pm$ 5

## Figure captions

**Figure 1:** Chemical structures of the AVK compounds used for the inhibition of the wild type and mutated VKORC1 expressed in *Pichia pastoris*

**Figure 2:** Map of France showing the distribution of *Vkorc1* mutations. Colored areas are areas from where tails of mice were received. Numbers correspond to the French administrative department. French departments are grouped in 4 geographical areas correlated with Table 2. Brittany is colored in green, North in purple, Marne in pink, South-East in yellow and South-West in blue. In the corresponding colored frame are marked mutations observed in this area.

**Figure 3:** Comparative resistance of mutated VKORC1 detected in house mice towards various AVK.

**Figure 4:** Comparative effect of single and corresponding double *Vkorc1* mutation(s) on the susceptibility to second generation AVK.

**Figure 1**

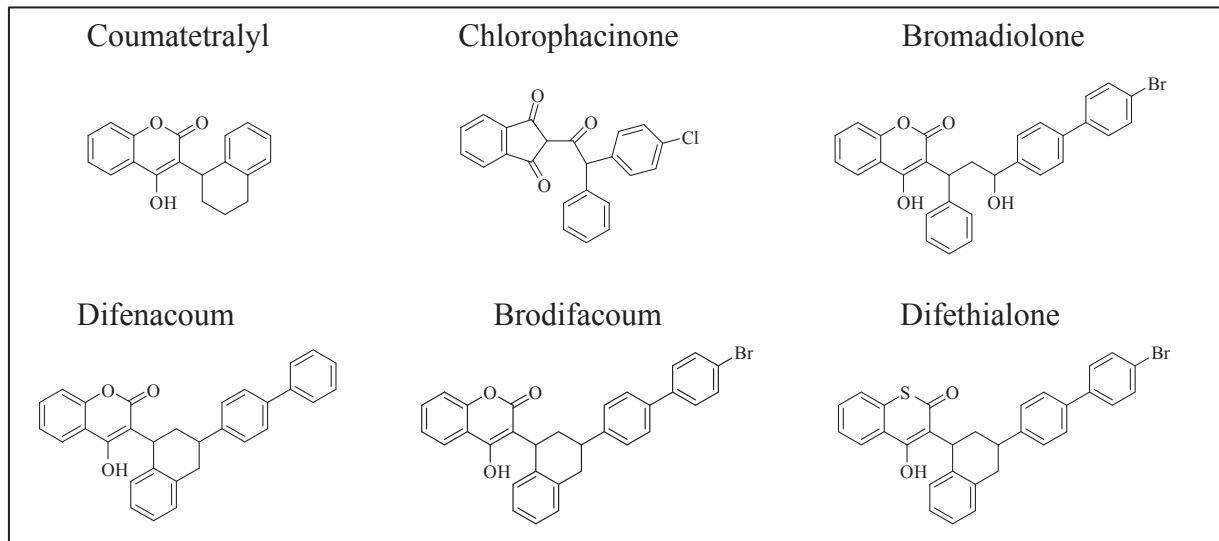
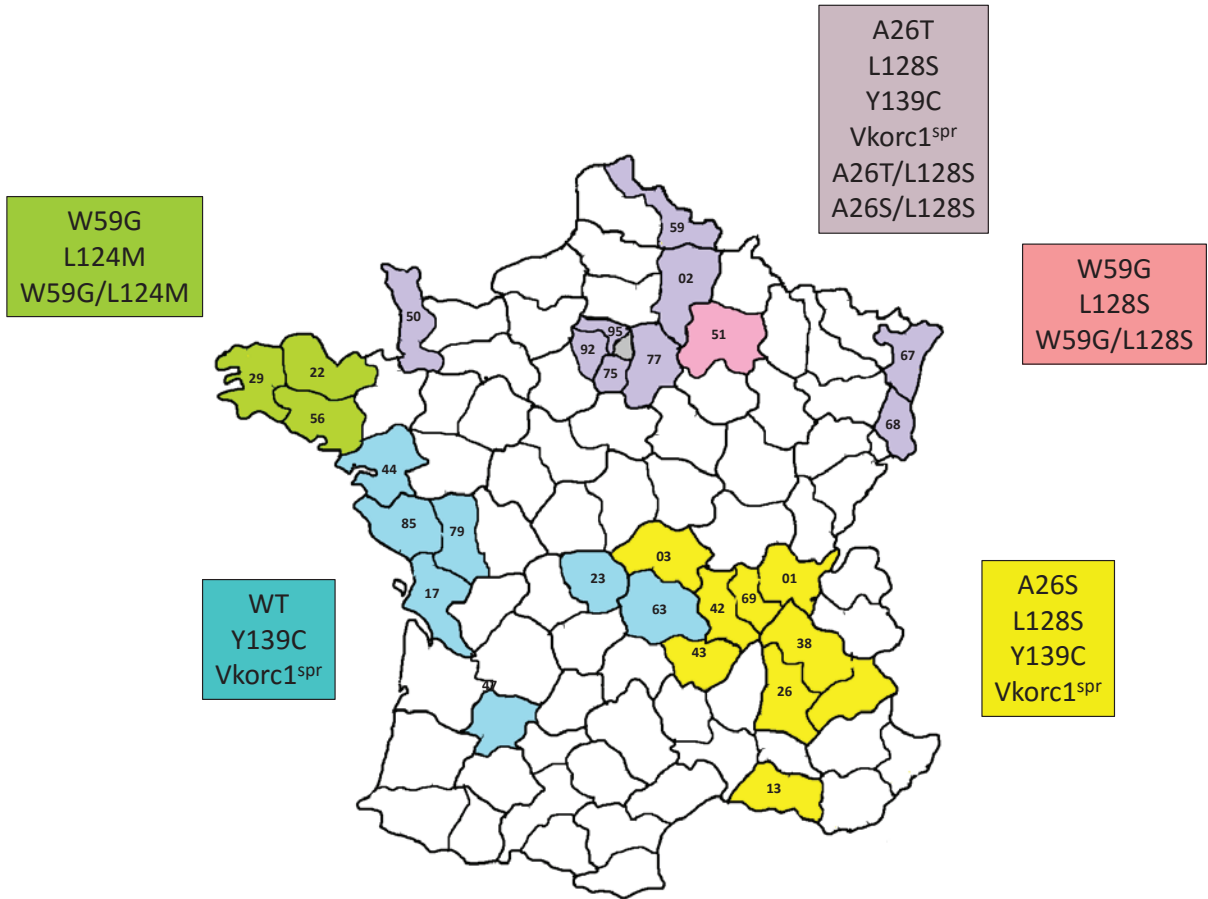
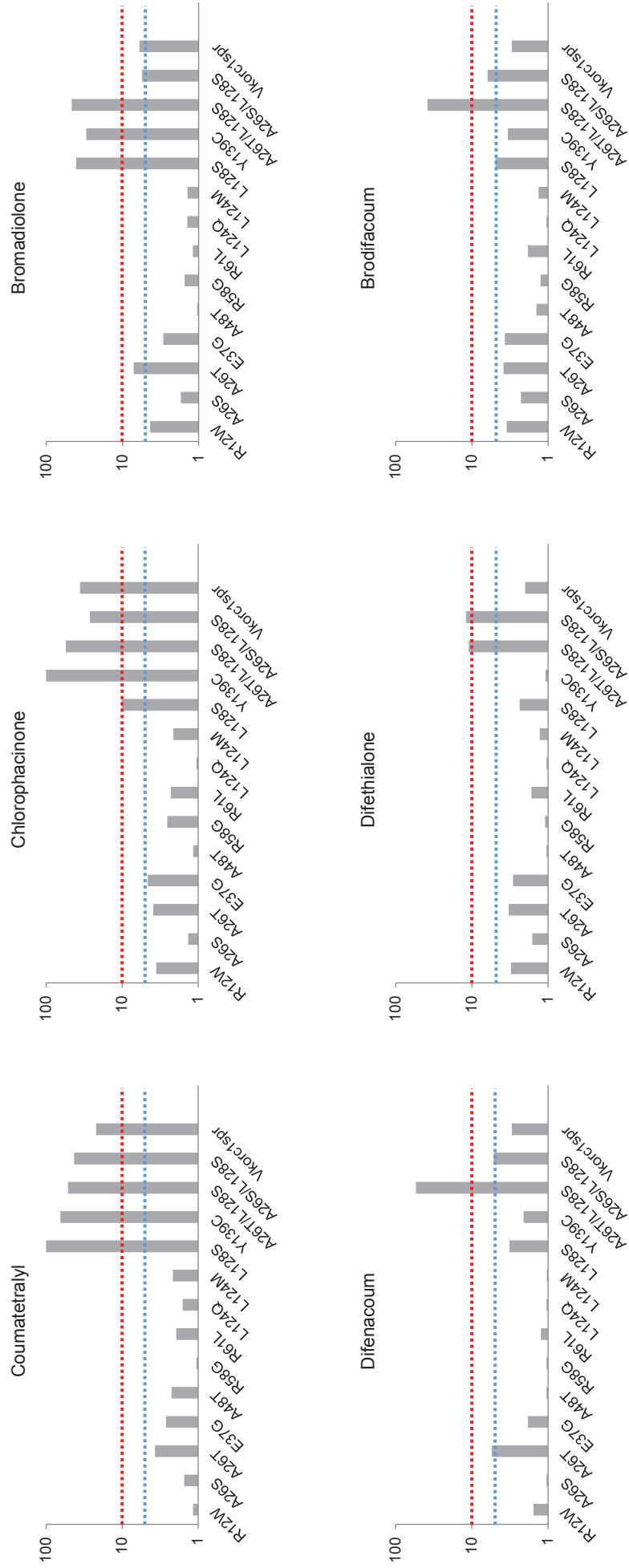


Figure 2

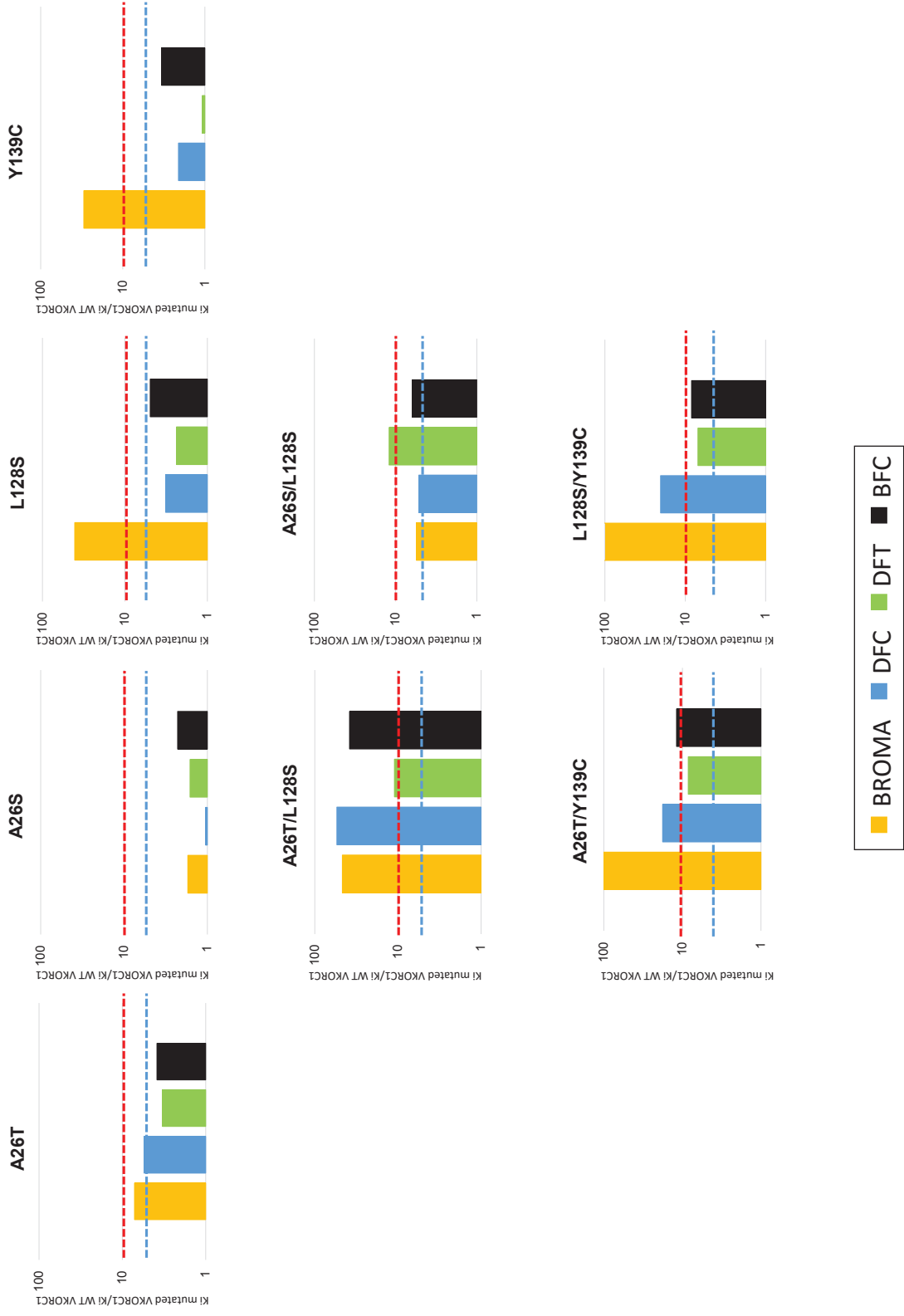


**Figure 3**





**Figure 4**



## II. Identification et caractérisation de la mutation Y25F découverte chez *Rattus rattus*

### A. Objectifs

L'étude Ratail a permis de découvrir une nouvelle mutation chez des rats noirs vivant dans une ferme en Espagne. Dans cette ferme, un traitement intensif à la Bromadiolone avait lieu, cependant la gestion de ces rongeurs à l'aide de cette molécule semblait inefficace. Nous avons déterminé les propriétés catalytiques de VKORC1 Y25F en fonction de 4 AVKs de première et seconde génération.

### B. Méthodes

La protéine VKORC1 Y25F a été exprimée en levure *Pichia pastoris*. Sa réponse aux AVKs a été évaluée par détermination des  $K_i$  vis-à-vis de la warfarine, de la bromadiolone, du difénacoum et de la diféthialone. Les  $K_i$  obtenus pour VKORC1 Y25F ont ensuite été comparés à ceux obtenus pour la VKORC1 WT de *Rattus rattus* et de *Rattus norvegicus* exprimés en levure.

### C. Principaux résultats

A partir de rats noirs piégés dans cette ferme en Espagne, le cytochrome B et le gène *vkorc1* ont été amplifiés par PCR et séquencés. Sur les 10 rats piégés, tous ont été identifiés comme étant de l'espèce *Rattus rattus* et porteurs de la mutation Y25F à l'état homozygote. Cette mutation engendre une augmentation des  $K_i$  des AVKs de première génération, mais pas ceux de seconde génération. Ainsi, cela permet aux rats noirs de survivre aux traitements de Bromadiolone réalisés sur le site du piégeage. Cette résistance résulte sûrement de la modification structurelle engendrée par la mutation Y25F. En effet, cette mutation entraîne une perte partielle de la structure hélicoïdale du TM4 modifiant ainsi la sensibilité de l'enzyme aux AVKs. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication présentée ci-dessous.

# 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

Joffrey Goulois,<sup>a,b</sup> Audrey Chapuzet,<sup>a</sup> Véronique Lambert,<sup>a</sup> Nolan Chatron,<sup>a,b,c</sup> Luba Tchertanov,<sup>c</sup> Lionel Legros,<sup>b</sup> Etienne Benoît<sup>a</sup> and Virginie Lattard<sup>a\*</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** In spite of intensive use of bromadiolone, rodent control was inefficient on a farm infested by rats in Zaragoza, Spain. While metabolic resistance was previously described in this rodent species, the observation of a target resistance to antivitamin K rodenticides had been poorly documented in *Rattus rattus*.

**RESULTS:** From rats trapped on the farm, *cytochrome b* and *Vkorc1* genes were amplified by PCR and sequenced in order to identify species and detect potential *Vkorc1* mutations. VKORC1-deduced amino acid sequences were thus expressed in *Pichia pastoris*, and inhibition constants towards various rodenticides were determined. The ten rats trapped on the farm were all identified as *R. rattus*. They were found to be homozygous for the g.74A>T nucleotide replacement in exon 1 of the *Vkorc1* gene, leading to p.Y25F mutation. This mutation led to increased apparent inhibition constants towards various rodenticides, probably caused by a partial loss of helical structure of TM4.

**CONCLUSION:** The p.Y25F mutation detected in the *Vkorc1* gene in *R. rattus* trapped on the Spanish farm is associated with the resistance phenotype to bromadiolone that has been observed. It is the first evidence of target resistance to antivitamin K anticoagulants in *R. rattus*.

© 2015 Society of Chemical Industry

**Keywords:** *Rattus rattus*; antivitamin K; VKORC1; resistance; mutation

## 1 INTRODUCTION

Rodents cause damage to about 20 million t of wheat and as much rice and other cereals, corresponding approximately to the quantity of cereals required to feed 600 million people per year. Rodents are also host to more than 40 zoonoses, including leptospirosis (more than 2 million serious cases per year and 100 000 human deaths per year worldwide), plague and some hantaviruses. Rodents also damage substructures and electric or electronic networks, which has important economic repercussions.

Among the rodent population, two *Rattus* species are predominant in Western Europe: *R. norvegicus* or brown rat and *R. rattus* or roof rat. Although they have phenotypical differences, distinguishing the two species is often difficult. The roof rat is an old species responsible for the black plague, causing death to more than a third of Europeans in the fourteenth century. On the other hand, the brown rat, which colonised Europe in the nineteenth century, was responsible for an important decrease in the roof rat population. In order to manage all consequent problems, it was necessary to find a solution to control extension of the rat population by different approaches – chemical, architectural and sanitary protection. Antivitamin K anticoagulants (AVKs) have been used

for 50 years. Their delayed action, with death occurring 3–7 days after bait consumption, obviates the alimentary aversion problem, which is a very important behavioural trait among rodents. AVKs are the only chemical compound family used as rodenticide in the European Union.

AVKs specifically inhibit VKORC1, an enzyme catalysing vitamin K 2,3-epoxide reductase (VKOR) activity.<sup>1,2</sup> This enzymatic activity is essential for recycling vitamin K 2,3-epoxide in vitamin K hydroquinone, which works with gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) to activate clotting factors II, VII, IX, X (vitamin K-dependent proteins or VKDP). The specific inhibition of VKORC1 by AVKs stops

\* Correspondence to: Virginie Lattard, USC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France.  
E-mail: virginie.lattard@vetagro-sup.fr

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

b Liphatech, Bonnel, France

c Centre de Mathématiques et de Leurs Applications (CMLA UMR 8536), Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan, France

clotting factor activation and results in a slow decrease in the initial stock of these clotting factors in the plasma, leading to delayed death of the rodent by haemorrhage.<sup>3–5</sup>

After 10 years of using AVKs as rodenticide, resistant rodents appeared in Europe<sup>6,7</sup> and also in the United States,<sup>8</sup> Canada,<sup>9</sup> Australia<sup>10</sup> and Japan.<sup>11</sup> Two main resistance mechanisms have since been described. A metabolic resistance of roof rats, partially documented in Japan, was assumed to occur through an over-expression of CYP3A.<sup>12,13</sup> A target resistance due to a decrease in susceptibility of VKOR activity to AVKs was also described. This mechanism was clarified when the *Vkorc1* gene encoding the enzyme that catalyses this activity was discovered.<sup>1,2</sup> The target resistance phenomenon, induced by mutations in the *Vkorc1* gene, has essentially been described in humans,<sup>14–17</sup> mice<sup>18,19</sup> and brown rats.<sup>20,21</sup> The frequency of target resistance is particularly very high in brown rats resident in Europe.<sup>22</sup> Target resistance has been poorly described in roof rats (or *R. rattus*). Recently, an invasion by roof rats was observed on a farm located in Zaragoza, Spain. Consecutive chemical control campaigns were unsuccessful, with no mortality of roof rats and continued fast reproduction of rats, suggesting resistance to bromadiolone. The purpose of the present study was to examine the resistance of this roof rat population to rodenticides and to gain a better understanding of the underlying mechanisms.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Study site and sampling

On a farm located near the city of Zaragoza in north-east Spain, traps were distributed in different buildings where the presence of rats was suspected. A total of ten rats were trapped and then euthanised. Tails were collected and stored in 70% alcohol for genetic analyses. Genomic DNA was extracted from a piece of tail using silica columns (Macherey Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's recommendations, and was used to amplify *cytochrome b* for species determination and to amplify *Vkorc1* for mutation detection.

### 2.2 Species determination

A quantity of 2 µL of genomic DNA extract was amplified by PCR using specific primers of *cytochrome b*.<sup>23</sup> The sequences of the sense primer cytb-S and the antisense primer cytb-AS were 5'-TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC-3' and 5'-AACAATGACATGAAAAATCATCGTT-3' respectively. *Cytochrome b* amplification was performed using cytb-S and cytb-AS (10 pmol) and GoTaq polymerase (1 unit; Promega, Charbonnières-les-bains, France) in a 25 µL reaction volume containing 2 µL of DNA, 5 µL of 5× GoTaq buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 90 s and a final extension step at 72 °C for 10 min. The amplified product was sequenced on both strands; the resulting sequence was submitted for blast analysis.

### 2.3 *Vkorc1* sequencing

A quantity of 2 µL of genomic DNA was amplified using specific primers of the *Vkorc1* gene. In order to sequence the totality of the *Vkorc1* gene, two sets of primers were used. The sequences of the first set of primers rVKOR-S1 and rVKOR-AS1 were 5'-GGTCTTCCCTCTGTGTCTG-3' and 5'-GGGTCACCAAGACATGAGGTG-3' respectively, and were used to

amplify the rat *Vkorc1* gene from nucleotide –36 to nucleotide +1141 (according to *R. rattus frugivorus Vkorc1*, accession number HM181985). The sequences of the second set of primers rVKORC1-S2 and rVKORC1-AS2 were 5'-ACTTGGGC AAGGCTCATGTG-3' and 5'-AAGAGTAGGGACAAGGTGGC-3' respectively, and were used to amplify the rat *Vkorc1* gene from nucleotide +848 to nucleotide +2183. Rat *Vkorc1* amplifications were performed using rVKOR-S1 and rVKOR-AS1 or rVKOR-S2 and rVKOR-AS2 (10 pmol) and Accuprime polymerase (1 unit; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in a 25 µL reaction volume containing 2 µL of DNA, 2.5 µL of 10× Accuprime buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 20 s, 59 °C for 20 s, 68 °C for 120 s and a final extension step at 68 °C for 10 min. The amplified products were sequenced on both strands; the obtained sequences were compared with *R. rattus* or *R. norvegicus Vkorc1* sequences published in GenBank.

### 2.4 Heterologous expression of wild-type and mutated *R. rattus* VKORC1

The coding sequence corresponding to *R. rattus* VKORC1 fused with a c-myc tag via a flexible (GGG)<sub>3</sub> at its 3' end was optimised for heterologous expression in yeast and synthesised by GenScript (Piscataway, NJ). The synthesised nucleotide sequence included EcoRI and XbaI restriction sites at its 5' and 3' ends respectively. This nucleotide sequence was subcloned into pPICZ-B (Invitrogen) and sequenced on both strands.

The construction of the rVKORC1 mutant was carried out using pPICZ-rVKORC1 as template with Quickchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's recommendations. The mutant was checked by sequencing, and was thus expressed in *P. pastoris* as described below. Recombinant wild-type (VKORC1<sup>WT</sup>) and mutant (VKORC1<sup>Y25F</sup>) VKORC1 proteins were expressed in *Pichia pastoris* as described previously by Hodroge et al.<sup>17</sup> Yeast microsomes were prepared from thawed yeast cells by differential centrifugation, as described previously.<sup>21</sup> Protein concentrations were evaluated by Bradford's method using bovine serum albumin as a standard. Microsomes were frozen at –80 °C and used for kinetic analysis.

### 2.5 Immunoblot analysis

Expression level quantification of VKORC1 proteins in microsomal fractions was determined by Western blotting. Microsomal proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto Immobilon-P membranes and probed with anti-c-myc antibodies (Invitrogen). The resulting immunocomplexes were visualised using alkaline-phosphatase-conjugated antimouse immunoglobulins as secondary antibodies and a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium solution. Quantification of the stained bands was performed by densitometry measurement using Scion Image software. The relative intensity of the signal was correlated with the quantity of microsomal proteins. The relation was linear from 0 to 50 µg for microsomal proteins. The expression level of rat VKOR<sup>Y25F</sup> was evaluated by comparison with the expression of *R. rattus* wild type VKORC1 (VKORC1<sup>WT</sup>). For this purpose, various amounts (from 0 to 20 µg) of microsomal proteins containing *R. rattus* VKORC1 (VKORC1<sup>WT</sup>) and various amounts of microsomal proteins containing rat VKORC1<sup>Y25F</sup> (from 0 to 20 µg) were analysed on the same Western blot.

## 2.6 VKOR activity assays and kinetics

Microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity was assayed as described previously.<sup>17,21</sup> The  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_i$  values were obtained from at least three separate experiments performed on two different batches of protein. The estimation of  $K_m$  and  $V_{max}$  values was achieved by the incubation of at least nine different concentrations of vit K > O (from 0.003 to 0.2 mM) to the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by non-linear regression to the Michaelis–Menten model using the R-fit program. In order to evaluate the inhibiting effect of warfarin on VKOR activity,  $K_i$  was determined after addition of various concentrations of anticoagulant to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vitamin K > O (from 0.003 to 0.2 mM) using anticoagulant concentrations from about 0.05 to  $20 \times K_i$ . Data were fitted by non-linear regression to the non-competitive inhibition model

$$v = \left\{ V_{max} / \left[ 1 + (I/K_i) \right] \right\} * \left[ S / (K_m + S) \right]$$

using the R-fit program.

## 2.7 Modelling and molecular dynamics simulations

The high-resolution crystallographic structure of VKOR from *Synechococcus* sp. (PDB id: 4NV5)<sup>24</sup> was retrieved from the Protein Data Bank (PDB)<sup>25</sup> and used as the suitable template for homology modelling of VKOR from *R. rattus*. The *in silico* models of the native VKORC1 (VKORC1<sup>WT</sup>) and its mutant Y25F (VKORC1<sup>Y25F</sup>) were generated by using the BLAST alignment of sequences and MODELLER for 3D model building.<sup>26</sup> Generated structural models consisting of 161 residues were minimised. Each model was integrated into the prepared phospholipid bilayers composed for a total of 200 lipid molecules of phosphatidylcholine (PC). Each protein integrated to the membrane was explicitly solvated using TIP3P<sup>27</sup> water molecules in a rectangular box with a minimum distance of 10 Å from protein to box wall; each system was then neutralised using monovalent ions (Cl<sup>-</sup>). The total number of atoms, including the protein, the phospholipid membrane, the water molecules and the counterions, was 58 241.

Molecular dynamics (MD) simulations were performed using the GROMACS 4.6.5 program package<sup>28</sup> running on TURING at IDRIS. The simulations were performed with a CHARMM-36 force field modified to support PC lipid simulations.<sup>29</sup> The simulation length was 100 ns, with the initial 20 ns considered to be the equilibration period; the other 80 ns of the trajectory was used for the analysis.

## 3 RESULTS

### 3.1 Localisation of the site invaded by roof rats

The Spanish farm localised close to Zaragoza was reported to be invaded by rats. Rats were observable all the day and were responsible for serious damage to infrastructures. In spite of the consumption of bait containing bromadiolone, no rat mortality was observed, suggesting resistance to bromadiolone. To evaluate this hypothesis, ten rats were trapped and euthanised. Identification of the rat species was based on the mitochondrial *cytochrome b* sequence. Amplified sequences presented 98% homology with sequences of *cytochrome b* published for *R. rattus*. The comparison of the sequence obtained from the trapped rats with the 85 bp partial sequence of *cyt b* used by Pagès *et al.*<sup>23</sup> to classify the Rattini tribe revealed full homology with the R1 group of the Rattini tribe described as containing only *R. rattus*.

### 3.2 Detection of *Vkorc1* mutations

To identify mutations in the *Vkorc1* gene, the coding sequences and splice junctions of the *Vkorc1* gene were amplified and sequenced in the ten rats trapped on the farm. Obtained sequences were compared subsequently with published *Vkorc1* sequences for *R. rattus frugivorus* (GenBank accession number HM181985), for *R. rattus alexandrinus* (GenBank accession number HM181979) and for *R. norvegicus* (GenBank accession number NM\_203335). Compared with the published *R. rattus Vkorc1* sequences, three nucleotide mutations were identified. The ten rats were found to be homozygous for the g.74A > T nucleotide mutation in exon 1 of the *Vkorc1* gene. The mutation changed a TAC encoding Tyr at codon 25 to a TTC encoding a Phe (Fig. 1). The two other mutations, also found at the homozygous state, were silent mutations. The first was located at nucleotide 1216 in exon 2 (g.1216C > T), while the second was located at nucleotide 2209 in exon 3 (g.2209A > G).

### 3.3 Functional consequences of Y25F mutation

To assess the consequences of p.Y25F mutation on the functional properties of VKORC1, wild-type VKORC1 and its Y25F mutant were overexpressed as c-myc-fused proteins in *P. pastoris*. Both proteins were efficiently expressed in *P. pastoris* with the same expected molecular mass of approximately 20 kDa. Western blot analysis showed that recombinant wild-type VKORC1 and its Y25F mutant were expressed at similar levels (data not shown).

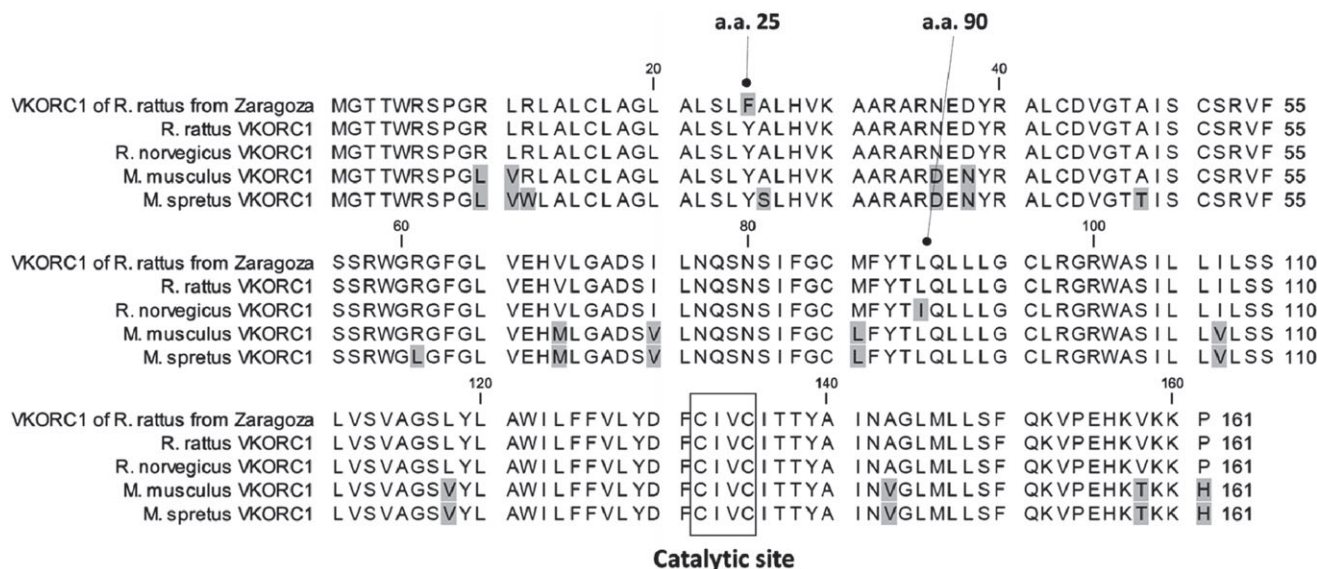
In order to compare the susceptibilities to AVKs of *R. rattus* VKORC1 and its Y25F mutant, inhibition constants towards various AVKs of wild-type VKORC1 were determined. Plots of the velocity of the VKOR activity catalysed by the recombinant *R. rattus* VKORC1 expressed in *Pichia pastoris* versus the substrate concentration in the presence of different concentrations of warfarin are presented in Fig. 2. Apparent  $K_m$  was not modified by warfarin. On the other hand, apparent  $V_{max}$  was lowered by the use of warfarin. This result revealed that warfarin inhibited VKOR activity catalysed by *R. rattus* wild-type VKORC1 in a non-competitive manner, as was previously reported for *R. norvegicus* VKORC1.<sup>21</sup> Data were fitted to the Michaelis–Menten model, which takes into account the presence of competitive, non-competitive or uncompetitive inhibitor by non-linear regression. A fit was possible when a model taking into account a non-competitive inhibitor only was used. Finally,  $K_i$  towards warfarin for *R. rattus* VKORC1 was  $0.32 \pm 0.07 \mu\text{M}$  (Table 1). The  $K_i$  values towards bromadiolone, difenacoum and difethialone were also determined and are presented in Table 1.  $K_i$  values determined for *R. norvegicus* VKORC1 are also reported to allow comparison of the susceptibility to AVKs between *R. rattus* and *R. norvegicus*.

The  $K_i$  values towards warfarin, bromadiolone, difenacoum and difethialone were determined with yeast microsomes expressing *R. rattus* VKORC1<sup>Y25F</sup>, as previously performed for wild-type VKORC1. As obtained for *R. rattus* wild-type VKORC1, AVKs inhibited VKOR activity catalysed by VKORC1<sup>Y25F</sup> in a non-competitive manner. The  $K_i$  value towards warfarin for VKORC1<sup>Y25F</sup> was increased sixfold compared with that obtained for wild-type VKORC1;  $K_i$  towards bromadiolone and difenacoum was increased threefold.  $K_i$  towards difethialone was similar to that obtained for wild-type VKORC1.

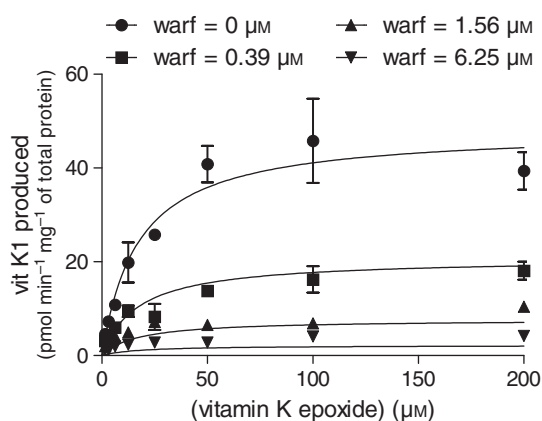
### 3.4 Structural consequences of Y25F mutation

The structure of the native and mutated VKOR (VKORC1<sup>WT</sup> and VKORC1<sup>Y25F</sup>) was similar. Each protein consists of a well-folded





**Figure 1.** Alignment of the amino acid sequence deduced from the sequencing of the *Vkorc1* gene in rats trapped on the Zaragoza farm with *R. rattus* VKORC1 or *R. norvegicus* VKORC1.



**Figure 2.** Inhibition by warfarin (warf) of the VKOR activity catalysed by the recombinant *R. rattus* VKORC1<sup>WT</sup> expressed in yeast microsomes. VKOR activity versus vit K1 > 0 (from 0 to 200 µM) was determined in the presence of four different concentrations of warfarin incubated with yeast microsomes. Each data point represents the mean ± SD of two determinations. The experimental results were fitted by non-linear regression using the non-competitive inhibition model.

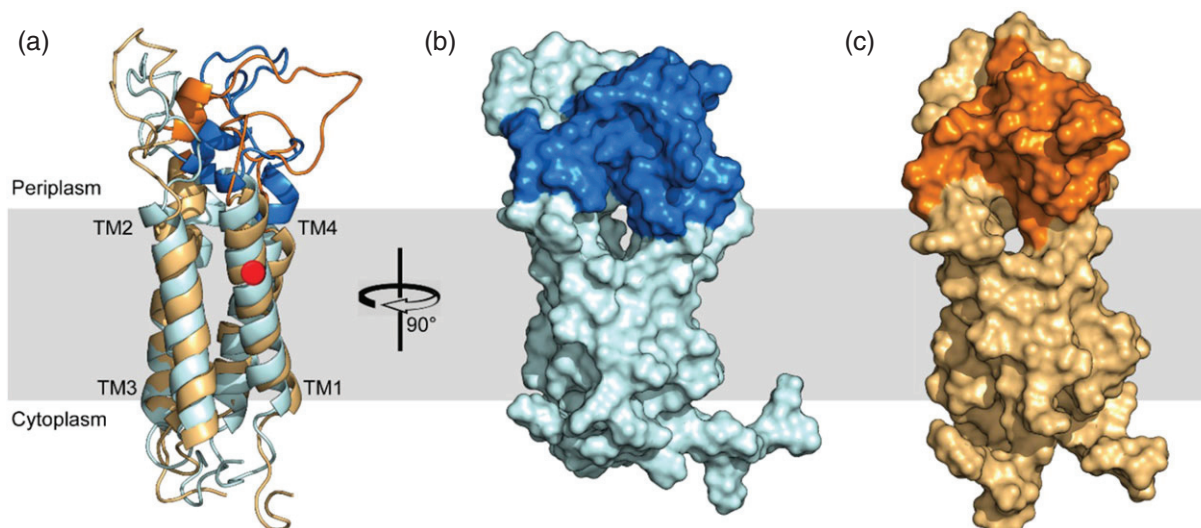
**Table 1.** Apparent inhibition constants ( $K_i$ ) towards various antivitamin K rodenticides obtained for yeast microsomes expressing recombinant *R. rattus* VKORC1 or *R. norvegicus* VKORC1 proteins. To determine the VKOR activity, standard reactions were performed in 200 mM of HEPES buffer (pH 7.4) containing 150 mM of KCl and 0.5 g L<sup>-1</sup> of microsomal proteins expressing *R. rattus* or *R. norvegicus* VKORC1 proteins. Each data point represents the mean ± SD of three individual determinations

	$K_i$ for <i>R. rattus</i> VKORC1 (µM)	$K_i$ for <i>R. norvegicus</i> VKORC1 (µM)
Warfarin (µM)	0.32 ± 0.07	0.50 ± 0.01
Bromadiolone (µM)	0.13 ± 0.02	0.07 ± 0.02
Difenacoum (µM)	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Difethialone (µM)	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01

to important molecular surface alteration and to active site pocket adjustment, as illustrated in Figs 3B and C.

#### 4 DISCUSSION

While resistance to rodenticides is frequently observed in *R. norvegicus* (or brown rats) in Europe, resistance to rodenticides has never been described in *R. rattus* (or roof rats) in Europe. However, resistance to rodenticides in roof rats is often suspected by pest control operators. Nevertheless, this resistance is in the majority of cases explained by a non-consumption of bait developed for the control of brown rat populations and thus unsuitable for roof rats. Worldwide, only one case of resistance to rodenticides has been reported in roof rats, in Japan.<sup>11</sup> The described roof rats were identified as resistant to warfarin, and this resistance was suspected to be a metabolic resistance due to an overexpression of CYP3A.<sup>12,13</sup> The present study was prompted by reports of an important site in Zaragoza, Spain, where a major proliferation of roof rats had been observed. In spite of successive pest control campaigns with bromadiolone only, no mortality of rats was observed. Resistance to bromadiolone and eventually to other rodenticides was therefore



$$\cos \alpha + \cos \beta = 2 \cos \frac{1}{2} (\alpha + \beta) \cos \frac{1}{2} (\alpha - \beta)$$

**Figure 3.** Structural models of the native VKOR (VKOR<sup>WT</sup>, in blue) and its mutant (VKOR<sup>Y25F</sup>, in orange): (a) superimposition of two structures shown as cartoon; (b) and (c) surface representation of VKOR<sup>WT</sup> (b) and VKOR<sup>Y25F</sup> (c) (rotated 90° through the y-axis). The structurally conserved domains are presented in light colours (blue in VKOR<sup>WT</sup> and orange in VKOR<sup>Y25F</sup>); regions manifesting the mutation-induced modifications are highlighted by bright (dark) colours. The position of the phospholipid membrane is delimited by grey colour.

suspected on this farm. Therefore, trapped rats were used as a source of genetic information.

In order to prevent any taxonomic confusion, the species was confirmed by sequencing the mitochondrial gene encoding cytochrome *b*. The sequence of this gene varies strongly with species (the homology between *cyt b* of *R. rattus* and *R. norvegicus* is less than 90%), and a partial 85 bp segment was shown to be an interesting tool for establishing group membership and estimating putative species boundaries.<sup>23</sup> Cytochrome *b* sequences of rats trapped on the Zaragoza farm present a homology of more than 98% with the published sequence for *R. rattus cytochrome b*, and the characteristic 85 bp segment presents full homology with the R1 group of the Rattini tribe described as containing only *R. rattus*.<sup>23</sup> This result was totally coherent with the initial suspicion of the pest control operator and confirmed that the rats trapped on the farm are roof rats or *R. rattus*.

To gain a better understanding of the origin of the resistance to bromadiolone observed in rats from the Zaragoza farm, the *Vkorc1* gene was sequenced to explore the potential target resistance due to *Vkorc1* gene mutations. Whereas target resistance in roof rats has never been described hitherto, the most frequent mechanism responsible for resistance to AVKs in brown rats and mice is target resistance explained by *Vkorc1*.<sup>18–21</sup> In Europe, p.L120Q, p.L128Q, p.Y139F, p.Y139C and p.Y139S are the five most frequently detected mutations in *R. norvegicus*, and these mutations explain most of the reported phenotype of resistance.<sup>22</sup> In mice, two major mutations, i.e. p.L128S and p.Y139C, are observed in Europe<sup>19</sup> and are associated with severe resistance to at least first-generation AVKs. Moreover, in mice, natural introgression of the *Vkorc1* gene from *Mus spretus* in the genome of *M. musculus domesticus* was reported.<sup>31</sup> This natural introgression implied the substitution of four amino acids in *M. musculus* VKORC1 (i.e. Arg-12, Ala-26, Ala-48 and Arg-61) by Trp, Ser, Thr and Leu, respectively, and leads to severe resistance to rodenticides.

In the present study, the *Vkorc1* sequences obtained from rats trapped on the Zaragoza farm are very similar to that previously reported for *R. rattus alexandrinus*.<sup>32</sup> Diaz *et al.*<sup>32</sup> showed that one single non-synonymous mutation leading to p.I90L substitution and six synonymous mutations differentiates *R. rattus* and *R. norvegicus*. The p.I90L substitution is found in VKORC1 of trapped rats, as described in *R. rattus alexandrinus*. On the other hand, in the *Vkorc1* coding sequence of trapped rats, two synonymous mutations are found in comparison with the sequence reported for *R. rattus alexandrinus*,<sup>32</sup> one located in exon 2 (i.e. p.L94L) and the other one located in exon 3 (i.e. p.A143A). Both synonymous mutations correspond to the sequence reported for *R. norvegicus*. Moreover, one non-synonymous mutation (g.74A > T) is found in exon 1 of *Vkorc1* coding sequence of trapped rats, in comparison to the sequence reported for *R. rattus alexandrinus*<sup>32</sup>, but also to sequences reported for *R. norvegicus*. The g.74A > T nucleotide mutation leads to replacement of Tyr-25 by Phe (i.e. p.Y25F). All the rats trapped on the Zaragoza farm were found to be homozygous for this mutation. The p.Y25F mutation has never been described in *R. rattus*, *R. norvegicus*, *M. musculus* or in humans. This mutation may be associated with the observed resistance phenotype, as it was described for the five principal mutations detected in brown rats.<sup>21</sup> Nevertheless, the p.Y25F mutation may also have no consequences for VKOR activity, as described for some mutations detected in brown rats<sup>18</sup> or in humans.<sup>17,33</sup> Because tails were collected from dead rats, livers were not usable for microsomes preparation and VKOR enzymatic characterisation. Thus, establishing the causality of this mutation in the observed resistance phenotype required further analyses.

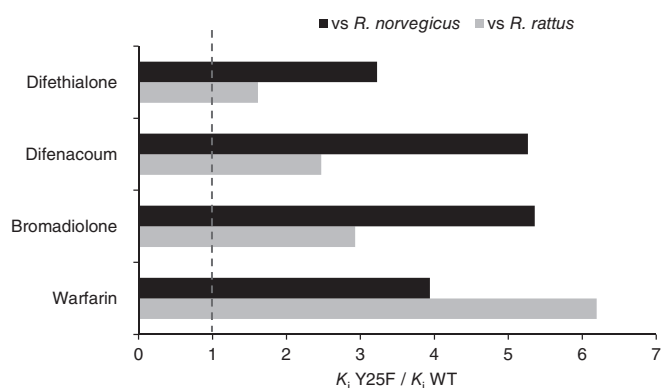
To address this challenge, recombinant *R. rattus* VKORC1<sup>WT</sup> and VKORC1<sup>Y25F</sup> expressed in *P. pastoris* were used to examine VKOR activity by a DTT-driven VKOR assay, as previously described.<sup>17,21</sup> This experimental method is a direct approach based on the measurement of the VKORC1 reaction product, vitamin K. This

experimental approach was recently challenged by other indirect approaches designed as cell-based VKOR assays<sup>33–35</sup> based on the measurement of the gamma-carboxylation of overexpressed clotting factors by the constitutive GGX in the presence of vitamin K hydroquinone produced by the overexpressed VKORC1. As the results obtained by the cell-based VKOR assays are conflicting and some limiting steps were pinpointed,<sup>36</sup> we chose the DTT-driven VKOR approach, as previously used for the characterisation of *R. norvegicus* VKORC1 and its mutated proteins.<sup>21</sup> The DTT-driven VKOR method was used because, contrary to all the other assays published, it was validated by the use of *ex vivo* and *in vivo* assays. The results obtained by using the DTT-driven VKOR method for *R. norvegicus*, in particular the resistance factors to VKAs, were successfully correlated with the results obtained by *ex vivo* and *in vivo* assays.<sup>21,37,38</sup> Resistance factors obtained by the DTT-driven VKOR approach using yeast microsomes expressing *R. norvegicus* VKORC1 proteins were shown to be totally coherent with resistance factors obtained by the DTT-driven VKOR approach using liver microsomes,<sup>21,37</sup> and with resistance factors obtained *in vivo* using strains of rats homozygous for wild-type VKORC1 or VKORC1<sup>Y139F</sup>.<sup>38</sup>

Because *R. rattus* VKORC1<sup>WT</sup> presents only the cognate type of amino acid substitution in position 90 compared with *R. norvegicus* VKORC1<sup>WT</sup> (Ile-90 in *R. norvegicus* is replaced by Leu-90 in *R. rattus*), we first characterised the consequence of this point replacement for susceptibility to AVKs. The catalytic properties of *R. rattus* VKORC1<sup>WT</sup> are still poor, and only characterisation of *R. norvegicus* VKORC1<sup>WT</sup> has previously been reported.<sup>21,37</sup> The  $K_m$  of  $11.9 \pm 0.84$  obtained for the recombinant *R. rattus* VKORC1<sup>WT</sup> towards vit K > O is similar to that determined for *R. norvegicus* VKORC1<sup>WT</sup>.<sup>21</sup> As expected, the cognate-type amino acid substitution in position 90 does not induce alteration of the catalytic properties of VKORC1 from *R. rattus* and *R. norvegicus*. The VKOR activity catalysed by the recombinant *R. rattus* VKORC1<sup>WT</sup> was inhibited by AVKs in a non-competitive manner, as previously described for *R. norvegicus* VKORC1<sup>WT</sup><sup>21</sup> or human VKORC1<sup>WT</sup>.<sup>17</sup> The  $K_i$  values obtained towards various AVKs (i.e. warfarin, bromadiolone, difenacoum, difethialone) were also similar to those determined for *R. norvegicus* VKORC1<sup>WT</sup>.<sup>21</sup> The cognate-type amino acid substitution in position 90 does not induce any difference between VKORC1 from *R. rattus* and *R. norvegicus* in their intrinsic susceptibility to AVKs.

If p.Y25F mutation does not modify the  $K_m$  values (i.e. the  $K_m$  is  $15.9 \pm 4.5$  for VKORC1<sup>Y25F</sup>) compared with VKORC1<sup>WT</sup>, it leads to clear resistance of VKORC1 to first-generation AVKs, as evidenced by a diminishing of VKORC1<sup>Y25F</sup> susceptibility to this type of AVK (sixfold) respective to VKORC1<sup>WT</sup> (Fig. 4). The resistance conferred by p.Y25F mutation to second-generation AVKs is more moderate, characterised by a three- and 2.5-fold decrease in VKORC1<sup>Y25F</sup> susceptibility to bromadiolone and difenacoum relative to *R. rattus* VKORC1<sup>WT</sup> (Fig. 4). No resistance to difethialone is induced by p.Y25F mutation. These observations confirm the involvement of p.Y25F mutation in the observed rat phenotype. Consequently, the detection and characterisation of p.Y25F mutation in *Vkorc1* of *R. rattus* is the first demonstration of the existence of target resistance in roof rats, as described in *R. norvegicus* or in *M. musculus domesticus*.

Three warfarin-binding interface domains in human VKORC1 protein may be involved in interaction with AVKs.<sup>39</sup> Tyr-25 is included in the first warfarin-binding interface domain, from Leu-22 to Val-29. In this domain, point mutations of other amino acids, particularly A26P mutations, were proposed to be associated with resistance to AVKs.<sup>14,17</sup> Tyr-25, strictly conserved between



**Figure 4.** Inhibition effect of various anticoagulants (warfarin, bromadiolone, difenacoum and difethialone) on *R. rattus* VKORC1<sup>Y25F</sup> expressed in yeast microsomes, in comparison with *R. rattus* VKORC1<sup>WT</sup> or *R. norvegicus* VKORC1<sup>WT</sup>.

VKORC1 proteins,<sup>40</sup> belongs to TM1. Replacement of Tyr-25 by Phe induces a partial loss of helical structure of TM4, which contains the third warfarin-binding interface. Indeed, the large and accessible pocket in VKOR<sup>WT</sup> is transformed into the narrow and partially hidden pocket in VKOR<sup>Y25F</sup>. These observations are highly consistent with the experimentally observed diminishing susceptibility of the VKORC1<sup>Y25F</sup> mutant to AVKs.

## 5 CONCLUSION

The present study demonstrates and proves the existence of a novel *Vkorc1* mutation in *R. rattus*. We established the resistance effect of the *R. rattus* VKORC1<sup>Y25F</sup> mutation to AVKs and proposed the causality of the missense *Vkorc1* mutation in the resistance phenotype observed for *R. rattus*. Our results represent the first description of target resistance in *R. rattus*, allowing the recommendation that the use of first-generation AVKs be discontinued for roof rats processing this mutation; third-generation AVKs seem to be more appropriate.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by ISI grant No. I1301001W 'NEORAMUS' from Bpi France, and access was granted to the HPC resources of IDRIS under allocation 2014-c2013077107 made by GENCI. We are grateful to B Charlier and N Pajor for access to the TopDyn cluster at ENS Cachan.

## REFERENCES

- Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A and Stafford DW, Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* **428**:541–544 (2004).
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ et al., *Nature* **427**:537–541 (2004).
- Furie B and Furie BC, The molecular basis of blood coagulation. *Cell* **53**:505–518 (2007).
- Suttie JW, Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem* **5**:459–477 (1985).
- Thijssen HH, Soute BA, Vervoort LM and Claessens JG, Paracetamol–warfarin interaction; NAPQ1, the toxic metabolite of paracetamol is an inhibitor of enzymes in the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* **92**:797–802 (2004).
- Boyle CM, Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature* **1**:517–525 (1960).
- Dodsworth E, Mice and spreading despite such poisons as warfarin. *Munic Eng Lond* **3746**:1668 (1961).



- 8 Jackson W and Kaukeinen D, Resistance of wild Norway rats in North Carolina to warfarin rodenticide. *Science* **176**:1343–1344 (1972).
- 9 Siddiqi Z and Blaine WD, Anticoagulant resistance in house mice in Toronto. *Can Environ Hlth Rev* **32**:49–51 (1982).
- 10 Saunders GR, Resistance to warfarin in the roof rat in Sydney. *NSW Search* **9**:39–40 (1978).
- 11 Naganuma K, Fujita A, Taniguchi N and Takada S, Warfarin susceptibility in the roof rat, *Rattus rattus*, in some locations of Tokyo. *Jap J Sanit Zool* **32**:243–245 (1981).
- 12 Sugano S, Kobayashi T, Tanikawa Y, Kojima H, Nakamura K, Uchida A *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* **31**:399–407 (2001).
- 13 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* **35**:62–66 (2007).
- 14 Bodin L, Perdu J, Diry M, Horellou MH and Loriot MA, 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* **6**:1436–1439 (2008).
- 15 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* **6**:1663–1670 (2008).
- 16 Watzka M, Geisen C, Bevans 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* **9**:109–118 (2011).
- 17 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* **10**:2535–2543 (2012).
- 18 Rost S, Pelz HJ, Menzel S, MacNicoll AD, León V, Song KJ *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* **6**:10–14 (2009).
- 19 Pelz HJ, Rost S, Müller E, Esther A, Ulrich RG and Müller CR, Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Manag Sci* **68**:254–259 (2012).
- 20 Pelz HJ, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg AC, Baert K *et al.*, The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* **170**:1839–1847 (2005).
- 21 Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E and Lattard V, Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys* **515**:14–20 (2011).
- 22 Grandemange A, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Benoit E and Berny P, Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manag Sci* **66**:270–286 (2010).
- 23 Pagès M, Chaval Y, Herbreteau V, Waengsothorn S, Cosson JF, Hugot JP *et al.*, Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. *BMC Evol Biol* **10**(184):1–27 (2010).
- 24 Liu S, Cheng W, Fowle Grider R, Shen G and Li W, Structures of an intramembrane vitamin K epoxide reductase homolog reveal control mechanisms for electron transfer. *Nature* **5**:3110 (2014).
- 25 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H *et al.*, The Protein Data Bank. *Nucl Acid Res* **28**:235–242 (2000).
- 26 Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M *et al.*, Comparative protein structure modeling using modeller. *Curr Protocols Bioinform* **5**:5–6 (2006).
- 27 Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura J, Impey RW and Klein ML, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* **79**:926–935 (1983).
- 28 Hess B, Kutzner C, Van der Spoel D and Lindahl E, Gromacs 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* **4**:435–447 (2008).
- 29 Jämbeck JPM and Lyubartsev AP, Derivation and systematic validation of a refined all-atom force field for phosphatidylcholine lipids. *J Phys Chem* **116**:3164–3179 (2012).
- 30 Rishavy MA, Usabalieva A, Hallgren KW and Bernkner KL, Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *J Biol Chem* **286**:7267–7278 (2011).
- 31 Song Y, Endepols S, Klemann N, Richter D, Matuschka FR, Shih CH *et al.*, Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice. *Curr Biol* **21**:1296–1301 (2011).
- 32 Diaz JC, Song Y, Moore A, Borchert JN and Kohn MH, Analysis of *Vkorc1* polymorphisms in Norway rats using the roof rat as outgroup. *BMC Genet* **11**:43 (2010).
- 33 Tie JK, Jin DY, Tie K and Stafford DW, Evaluation of warfarin resistance using transcription activator-like effector nucleases-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells. *J Thromb Haemost* **11**:1556–1564 (2013).
- 34 Czogalla KJ, Biswas A, Wendeln AC, 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* **122**:2743–2750 (2013).
- 35 Fregin A, Czogalla KJ, Gansler J, Rost S, Taverna M, Watzka M *et al.*, A new cell culture-based assay quantifies vitamin K2,3-epoxide reductase complex subunit 1 function and reveals warfarin resistance phenotypes not shown by the dithiotreitol-driven VKOR assay. *J Thromb Haemost* **11**:872–880 (2013).
- 36 Hallgren KW, Qian W, Yakubenko AV, Runge KW and Berkner KL, r-VKORC1 expression in factor IX BHK cells increases factor IX carboxylation but is limited by saturation of another carboxylation component or by a shift in the rate limiting step. *Biochemistry* **45**:5587–5598 (2006).
- 37 Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B, Billeret M, Berny P and Benoit E, Warfarin resistance in a French strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol* **19**:379–385 (2005).
- 38 Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Berny P and 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 Genom* **19**:742–750 (2009).
- 39 Czogalla KJ, Biswas A, Wendeln AC, 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* **122**:2743–2750 (2013).
- 40 Goodstadt L and Ponting CP, Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci* **29**:289–292 (2004).

### **III. Etude des conséquences de l'introggression du gène *vkorc1 spretus* dans des souris *Mus musculus domesticus* dans le phénotype de résistance aux AVKs**

#### **A. Objectifs**

Le projet Ratail a permis de démontrer l'existence de souris domestiques introgressées avec le gène *vkorc1 spretus* en France. Ces souris ont été piégées dans une boulangerie de Lyon. Nous avons déterminé dans un premier temps le phénotype de résistance de ces souris par des tests in vivo de consommation d'appâts AVKs de première et seconde génération. Ensuite, dans un second temps, nous avons déterminé si ce phénotype de résistance est exclusivement dû à l'introggression de ce gène *vkorc1*.

Nous avons également procédé à l'expression hétérologue et à l'étude catalytique de la VKORC1 *spretus* qui diffère de la VKORC1 de la souris domestique par 4 mutations caractéristiques. Puis de façon à comprendre le rôle de chacune des mutations ou bien de l'interaction entre chacune de ces mutations, nous avons procédé à l'expression hétérologue de VKORC1 de souris mutée en un seul point (chacune des 4 mutations) ou en deux points ou en trois points.

#### **B. Méthodes**

Les souris introgressées *spretus* mâles et femelles ont été exposées à 3 AVKs de première génération : le coumatétralyl 375 ppm, la chlorophacinone 50 ppm, et la bromadiolone 50 ppm, et à 4 AVKs de seconde génération : le difenacoum 50 ppm, la diféthialone 25 ppm, le brodifacoum 50 ppm et le flocoumafène 50 ppm, durant 5 jours. Après ces 5 jours, l'appât a été remplacé par des bouchons et un suivi de la mortalité a été réalisé durant 17 jours. Au final, chaque test a duré 21 jours. Les souris survivantes après 21 jours ont été qualifiées de résistantes. En parallèle de chaque groupe de souris introgressées *spretus*, un groupe de souris sensibles était associé. Le foie de chacune des souris a été prélevé afin de doser les concentrations en AVKs présents. Ensuite, à partir de microsomes de foie de souris introgressées *spretus*, l'activité VKOR a été évaluée par détermination des  $K_i$  vis-à-vis des mêmes molécules utilisées lors du test in vivo. Enfin, la VKORC1 *spretus* a été exprimée en levure *pichia pastoris* et sa réponse aux AVKs a été évaluée de la même manière qu'à partir de microsomes de foie.

## C. Principaux résultats

### 1. Etude *in vivo* et *in vitro* de la résistance conférée par l'introgession de la *vkorc1 spretus*

Les souris mâles et femelles introgressées *spretus* sont résistantes aux coumatétralyl, à la chlorophacinone et à la bromadiolone. Une faible résistance est observée pour le difénacoum, le brodifacoum, la diféthialone et le flocoumafène. Les Ki obtenus à partir de microsomes de foie montrent des facteurs de résistance importants pour les souris introgressées *spretus* pour les AVKs de première génération et faibles pour les AVKs de seconde génération. Ces résultats sont donc cohérents avec ceux obtenus avec les tests *in vivo*. De plus, les souris femelles semblent moins sensibles que les mâles aux AVKs. Cette tendance est également retrouvée avec les microsomes de foie. Nous avons montré que les concentrations en AVKs dans le foie des souris introgressées *spretus* et le foie des souris WT sont identiques, permettant de conclure que la résistance métabolique ne participe pas au phénotype de résistance des souris introgressées *spretus*. Pour terminer, nous avons montré que les facteurs de résistance obtenus à partir de la VKORC1 *spretus* exprimée en levure sont cohérents avec ceux provenant de microsomes de foie. Ainsi, le phénotype de résistance des souris introgressées *spretus* est exclusivement dû au 4 SNPs présents sur la *vkorc1 spretus*.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en soumission présentée ci-dessous.

**Study of the efficiency of anticoagulant rodenticides to control *Mus musculus domesticus* introgressed with *Mus spretus Vkorc1***

*Running title: Resistance to rodenticides due to Vkorc1<sup>SP</sup> genotype in Mus musculus domesticus*

Joffrey Goulois<sup>1,2</sup>, Claire Hascoët<sup>2</sup>, Khedidja Dorani<sup>1</sup>, Stéphane Besse<sup>1</sup>, Lionel Legros<sup>2</sup>, Etienne Benoit<sup>1</sup> and Virginie Lattard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> USC 1233 INRA-VetAgro Sup, Veterinary School of Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France

<sup>2</sup> Liphatech, Bonnel, 47480 Pont du Casse, France

Corresponding author: Virginie Lattard

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

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

## ABSTRACT

**BACKGROUND :** Antivitamin K anticoagulant (AVK) rodenticides are commonly used to control rodent pests worldwide. They specifically inhibit the VKORC1 enzyme essential for the recycling of vitamin K, and thus prevent blood clotting and cause death by haemorrhage. Numerous mutations or polymorphisms of the *Vkorc1* gene were reported in rodents and some lead to resistance to rodenticides. In house mice (*Mus musculus domesticus*), adaptative introgression of the *Vkorc1* gene from the Algerian mouse (*Mus spretus*) was reported. This adaptative introgression causes the substitution of four amino acids in *M. musculus domesticus*.

**RESULTS:** The consequences of introgression were assessed by (i) the characterization of the *in vivo* resistant phenotype of adaptative *Vkorc1*<sup>SPF</sup>-introgressed mice, (ii) the characterization of the *ex vivo* resistance phenotype of the liver VKOR activity and (iii) the comparison of these results with the properties of recombinant VKORC1<sup>SPF</sup> protein expressed in yeast. The resistance factor induced by the four introgressed polymorphisms obtained using these three approaches was dependent on the used AVKs (from 1 to 120) but were highly correlated among the three approaches.

**CONCLUSION:** The 4 introgressed polymorphisms were clearly the cause of the strong resistant phenotype observed in the field. In the context of strong selection pressure due to the extensive use of AVK, this resistant phenotype may explain the widespread distribution of this genotype from Spain to Germany.

**Keywords:** *Mus musculus domesticus* ; *Mus spretus* ; antivitamin K ; VKORC1 ; resistance ; mutation

## 1 INTRODUCTION

Rodents are responsible for the degradation and the destruction of numerous cereal crops. They are also carriers of many zoonotic pathogens. Moreover, they are also responsible for damages to substructures, electronic or electric networks. Antivitamin K molecules (AVKs) are the main chemical rodenticides used in the world. These molecules block the vitamin K recycling and thus limit the production of the vitamin K-dependent clotting factors (II, VII, IX and X)<sup>1</sup>. As a consequence, AVKs provoke an internal hemorrhage and the death of the intoxicated rodents. The VKOR enzyme is encoded by the *Vkorc1* gene simultaneously described in 2004 by Li et al<sup>2</sup> and Rost et al<sup>3</sup>.

The extensive use of these rodenticides for more than 50 years led to the selection of rodents resistant to certain compounds of this class. Two resistant mechanisms were described. A metabolic resistance due to the increased metabolism of AVKs as suggested in roof rats (*Rattus rattus*)<sup>4,5</sup> which could also be detected in brown rats (*Rattus norvegicus*) even in association with the target resistance mechanism<sup>6,7</sup>. The target resistance corresponds to mutations or polymorphisms (SNPs) in the *Vkorc1* gene resulting in a decrease of the inhibitory effect of AVKs towards the VKOR activity catalyzed by VKORC1 enzyme. Numerous mutations or SNPs have been detected in this gene that are associated with a resistant phenotype in rats<sup>8-10</sup>, mice<sup>8,9</sup> and humans<sup>11,12</sup>. The use of recombinant VKORC1 enzymes expressed in yeast<sup>10,12,13</sup> appears to be a useful tool to study the resistance associated with *Vkorc1* mutations or SNPs. This experimental approach was recently challenged by other indirect approaches designed as cell-based VKOR assays<sup>14,15</sup>. Nevertheless, the resistance factors conferred by Y139F, Y139C and Y139S SNPs determined using the recombinant enzymes were positively correlated with the results obtained by *ex vivo* and *in vivo* assays<sup>16,17</sup>. In house mice (*Mus musculus domesticus*) three SNPs seems to be particularly frequent, the L128S and Y139C SNPs and a set of 3 or 4 SNPs p.Arg12Trp, p.Ala26Ser, p.Ala48Thr and/or p.Arg61Leu. This set of 3 or 4 SNPs seems to be the consequence of the adaptive introgression of *Vkorc1* gene from the Algerian mouse (*Mus spretus*) into the genome of *Mus musculus domesticus*<sup>18</sup>. A part of about 20 MB around the *Vkorc1* gene in chromosome 7 of *Mus spretus* was introgressed in the *Mus musculus domesticus* genome<sup>19</sup>. Other pieces of the *Mus spretus* genome were also introgressed in the *Mus musculus domesticus* genome but the consequences are unknown. An initial crossing between these two mice species might have occurred in their cohabitation area (North Africa or Spain). Descendants that mated with *Mus musculus* acquired the *Vkorc1* gene of the *Mus spretus* species (*Vkorc1*<sup>SPR</sup>). *Mus musculus*

with *Vkorc1<sup>SPF</sup>* were found in Spain and Germany, but not in Italy or Greece and appear to be resistant to coumatetralyl, bromadiolone and difenacoum<sup>18</sup>.

In France, such mice were trapped in a French bakery of Lyon and were considered resistant to AVKs by pest control operators. After establishing a strain with these mice in our animal facilities, we characterized their *in vivo* resistant phenotype, the *ex vivo* resistance phenotype of their liver VKOR activity and compared these results with the resistance factors obtained using the recombinant VKORC1<sup>SPF</sup> protein expressed in yeast.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animals**

Twenty *Mus musculus domesticus* wild mice resistant to rodenticides were trapped in a French bakery of Lyon (France). Mice were acclimated in the animal facilities of VetAgro Sup in Lyon (France) and maintained by intercrossing. Animals received a standard feed (Scientific Animal Food and Engineering, reference A04 for adult rodent, Augy, France) and water *ad libitum*. Experimental research on these mice was performed according to an experimental protocol following international guidelines and approved by the ethics committee of the Veterinary School of Lyon.

### **2.2 Species identification**

Species identification was based on mitochondrial *cytochrome b* sequence and conducted as previously described by Goulois et al (2015)<sup>13</sup>.

### **2.3 *Vkorc1* sequencing**

In order to sequence the totality of the *Vkorc1* gene, two sets of primers were used. The sequences of the first set of primers sVKOR-S1 and sVKOR-AS1 were (5'-GATTCTTCCCTCCTGTCC-3') and (5'-AGACCCTGTCTCAAAACCTA-3'), respectively, and were used to amplify mouse *Vkorc1* gene from nucleotide -36 to nucleotide +1727. The sequences of the second set of primers sVKORC1-S2 and sVKORC1-AS2 were (5'-GAAAGCAGAACACTTAGCAGG-3') and (5'-AACCAACAGCAGAATGCAGCC-3'), respectively, and were used to amplify the mouse *Vkorc1* gene from nucleotide (+)1252 to nucleotide (+)2512. Mouse *Vkorc1* amplifications were performed using sVKOR-S1 and sVKOR-AS1 or sVKOR-S2 and sVKOR-AS2 (10 pmol), Accuprime polymerase (1 units,



Invitrogen) in a 25  $\mu$ l reaction volume containing 2  $\mu$ l DNA, 2.5  $\mu$ l 10X Accuprime buffer and 200  $\mu$ M of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94°C for 3 min followed by 40 cycles at 94°C for 20 s, 64°C for 20 s, 68°C for 50 s, and a final extension step at 68°C for 10 min. The amplified products were sequenced on both strands; the obtained sequences were compared to published *Mus musculus domesticus* (Genbank accession n°AC124602) and *Mus spretus Vkorc1* sequences (Genbank accession n°GQ905711).

## 2.4 Genotyping

This genotyping method was used to specifically detect the R61W mutation. Genomic DNA was extracted from tail sample using the Macherey-Nagel Nucleo-spin Tissue extraction kit (Hoerd, France). The allele-specific PCR method employed two pairs of primers purchased from Eurogentec (Angers, France). The forward primer was one of the two primers which the three prime nucleotide of the first one matched the *Vkorc1* sequence of the SD strain (i.e. the rat genome sequence of the *Vkorc1*; R61-primer: 5'TCTCCTCTCGGTGGGGCCT3') and the three prime nucleotide of the other matched the mutation in the *Vkorc1* sequence of the donor strain (L61-primer: 5'TCTCCTCTCGGTGGGGCCG3'). The reverse primers matched the *Vkorc1* sequence of the rat genome sequence for the *Vkorc1* (5'CAGGCAACCAAATATGCTGT3'). We amplified 106 base pairs of *Vkorc1* gene using quantitative real-time PCR (qPCR) in a Thermocycler Mx3000P Stratagene (Massy, France). The reaction mixture contained 5X HOT BIOAmp EvaGreen qPCR Mix (no ROX). The 15  $\mu$ L reactions contained 2 $\mu$ L of genomic DNA, 1pmol/ $\mu$ L of each forward and reverse primers, 5x EvaGreen qPCR buffer including dNTPs, HOT BIOAmp DNA polymerase, MgCl<sub>2</sub> at 12.5mM, EvaGreen dye. The cycling was initiated by one denaturation step at 95°C for 15 min; followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 65°C for 40 s and 72°C for 30 s each. Fluorescence from both SYBER dyes was recorded at the annealing step. The point at which the PCR product is first detected above a fixed threshold, the thermal cycle threshold (C<sub>t</sub>), was determined for each sample in duplicate, and the average C<sub>t</sub> of duplicate sample was calculated. The three possible genotypes R61/R61, R61/L61 and L61/L61 were deduced from the differences between their characteristic cycle threshold values ( $\Delta$ C<sub>t</sub>), that is the difference of C<sub>t</sub> values between the matched and the mismatched primer extension for homozygous mice, and the absence of such a difference in C<sub>t</sub> values for heterozygous animals.



## 2.5 No-choice feeding test with AVK

No-choice feeding tests were performed on mice previously genotyped as homozygous for *Vkorc1*<sup>spr</sup> genotype or *Vkorc1*<sup>dom</sup> genotype. Mice were divided according to their genotype in groups of 10 male or female mice. Individuals were weighed before the start of the test. Mice were fed with commercial ready baits containing either 0.0025% difethialone, 0.005% brodifacoum, 0.005% difenacoum, 0.005% flocoumafen, 0.005% chlorophacinone, 0.005% bromadiolone, or 0.0375% coumatetralyl. Feeding periods of 4 days were used for males and females homozygous for *Vkorc1*<sup>spr</sup> or *Vkorc1*<sup>dom</sup> genotype. Remaining bait was weighed daily and the intake of bait recorded. Mortality of mice was also observed daily. At the end of the feeding period with toxic baits, animals were given diet A04 again, water *ad libitum* and observed daily for 17 days. The criterion for resistance was survival for 21 days.

## 2.6 AVK concentration in liver

Residues of AVK were measured in liver when mice homozygous for *Vkorc1*<sup>spr</sup> and *Vkorc1*<sup>dom</sup> were found dead during the no-choice feeding test in order to compare residues concentration between genotypes. Liver tissue (1g) was extracted with acetone by using an Ultra Turrax tissue disperser from IKA Labortechnik ® (VWR International, Strasbourg, France). Extract was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Supernatant was thus 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 rest was dried at 60°C under gentle nitrogen flow. The final dry extract was dissolved in methanol and AVK concentrations were analysed by HPLC on a reverse phase C-18 column (4.6×150 mm, 5 µm; Waters, Milford, MA, U.S.A.) at a detection wavelength of 258, 260 and 267 nm, for difenacoum, difethialone and brodifacoum, respectively. The C-18 column was heated to 40°C for difenacoum and brodifacoum and 30°C for difethialone. A gradient elution system was used with a flow rate of 1 mL/min: from 30% methanol/70% water (acidified with 0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) to 70% methanol/30% water at 10 min for difenacoum; from 30% acetonitrile/70% water (acidified with 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) to 90 acetonitrile/10% water at 14 min for brodifacoum and from 60% acetonitrile/40% water (acidified with 0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) to 75 % acetonitrile/25% water at 10 min for difethialone.

## 2.7 Preparation of liver microsomes

Liver cell microsomes were prepared from fresh liver cells by differential centrifugation, as described previously by Moroni et al (1995)<sup>20</sup>. Protein concentrations were evaluated by the method of Bradford (1976)<sup>21</sup> using bovin serum albumin as a standard. Microsomes were frozen at -80°C and used for kinetic analysis.

## 2.8 Heterologous expression in *Pichia pastoris*

Heterologous expressions of *Mus musculus domesticus* and *Mus spretus* VKORC1 proteins were performed in *Pichia pastoris* as described previously<sup>10</sup>.

## 2.9 Vitamin K epoxide reductase activity (VKOR) assays and kinetics

Microsomal VKOR activity was assayed as described previously<sup>22</sup> and characterization of the VKOR activity was performed by the determination of  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_i$  towards various AVKs as described previously<sup>10,12,13,22</sup>. Resistance factor of the VKOR activity catalyzed by VKORC1<sup>SPR</sup> was calculated by dividing the  $K_i$  obtained for VKORC1<sup>SPR</sup> by the corresponding  $K_i$  obtained for VKORC1<sup>dom</sup>.

## 2.10 Statistical analysis

In no-choice feeding tests, comparison of survival between treatments was done using a Log-rank test. Comparison of total consumption of active substance between groups was done using Kruskal-Wallis tests with the R-fit program.

For enzymatic analysis, data are presented as the mean  $\pm$  SD of three individual measurements. Multiple comparisons between groups were done using Kruskal-Wallis tests. Comparison between two groups was done using Mann-Whitney tests.

# 3 RESULTS

## 3.1 Trapping of resistant mice in a French bakery

Amplified *cytochrome b* sequences of trapped mice had 99% of homology with sequences of *cytochrome b* published for *Mus musculus domesticus*. Moreover, four nucleotide changes were identified in the *Vkorc1* gene of trapped mice compared to the published *M. musculus domesticus* *Vkorc1* sequence: the g.34C>T, g.76G>T, g.111A>G, g.142G<A nucleotide

changes in exon 1 and the g.976G>T nucleotide change in exon 2 of the *Vkorc1* gene, genotype corresponding to *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype. These nucleotide changes led to p.R12W, p.A26S, p.E37E, p.A48T and p.R61L SNPs.

### **3.2 *In vivo* resistance due to *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype versus anticoagulant molecules**

Mortality results and mean anticoagulant molecule consumption obtained for mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype are presented in Table 1. At day 21, 100% of the female mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype treated with coumatetralyl (375 ppm), chlorophacinone (50 ppm), bromadiolone (50 ppm) were alive despite normal values of consumption of baits, while 80% of the female mice treated with difenacoum (50 ppm) and 100% treated with difethialone (25 ppm), brodifacoum (50 ppm) or flocoumafen (50 ppm) were dead. For males, 80, 50 and 40% of the mice treated, respectively, with coumatetralyl (375 ppm), chlorophacinone (50 ppm) or bromadiolone (50 ppm) were still alive despite normal values of consumption of baits, while 100% of the male treated with difenacoum (50 ppm), difethialone (25 ppm), brodifacoum (50 ppm) or flocoumafen (50 ppm) were dead. For mice homozygous for *Vkorc1*<sup>dom</sup>, mortality was higher than 90% for both sexes whatever the used AVK was, while consumption of baits was similar to that measured for mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype (data not shown). Concentrations of residues of AVK in livers at the death of animals were similar between genotype, except for males that died in trials with difenacoum where AVK concentration was 5 fold-higher in mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> compared to mice homozygous for *Vkorc1*<sup>dom</sup> (Table 2).

### **3.3 Characterization of the VKOR activity catalyzed by liver microsomes of mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype**

Kinetics parameters of the VKOR activity catalyzed by liver microsomes of male or female mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype or homozygous for *Vkorc1*<sup>dom</sup> genotype were analyzed by measuring the velocity of the reaction as a function of the vitamin K epoxide concentration (Table 3). In male and female mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype, apparent  $V_{max}$  were, respectively,  $33.4 \pm 4.0$  and  $53.6 \pm 8.1$  pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>; apparent  $K_m$  were  $22.8 \pm 9.6$  and  $34.9 \pm 15$ , respectively.

Independent of AVKs used, apparent  $K_m$  was never modified by the addition of anticoagulant molecules while apparent  $V_{max}$  was lowered by the use of anticoagulant molecules. Modeling of the data using a non-competitive equation gave a correct fit allowing the determination of

$K_i$  parameters. Systematically,  $K_i$  constants were higher in mice homozygous for  $Vkorc1^{SPR}$  genotype compared to mice homozygous or heterozygous for  $Vkorc1^{dom}$  genotype (Table 4).

### 3.4 Characterization of the VKOR activity catalyzed by yeast microsomes expressing *Mus spretus* VKORC1 proteins and *Mus musculus* VKORC1 proteins.

The VKOR activity catalyzed by recombinant yeast expressing either VKORC1<sup>dom</sup> or VKORC1<sup>SPR</sup> was a linear function of time and protein (results not shown). The reaction rates of recombinant VKORC1 enzymes towards vitamin K<sub>1</sub> epoxide followed the Michaelis–Menten model allowing the determination of kinetic parameters.  $K_m$  were, respectively, 25  $\mu$ M when the reaction was catalyzed by recombinant yeast expressing VKORC1<sup>dom</sup>; 24  $\mu$ M when the reaction was catalyzed by recombinant yeast expressing VKORC1<sup>SPR</sup>.

All AVKs were able to inhibit the VKOR activity catalyzed by VKORC1<sup>dom</sup> and VKORC1<sup>SPR</sup> proteins, but the concentrations used to inhibit VKORC1<sup>SPR</sup> were much stronger than those required to inhibit VKORC1<sup>dom</sup>. Apparent  $K_m$  was not modified by the addition of AVKs, while apparent  $V_{max}$  was lowered. Modeling of the data using non-competitive equation gave a correct fit allowing the determination of  $K_i$  parameters for VKORC1<sup>dom</sup> and VKORC1<sup>SPR</sup>, and thus calculation of resistance factors induced by the four *Vkorc1* SNPs for each AVK (Fig. 1). Depending on the AVK, the resistance factor varied from 2.3 for difethialone to 35 for chlorophacinone.

## 4 DISCUSSION

House mice with the four SNPs p.R12W, p.A26S, p.A48T and p.R61L corresponding to the *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype are present in France (specifically in Lyon). The sequence of the cytochrome b of these mice have high homology (99%) with the sequence of *Mus musculus domesticus* and more limited homology (92%) with *Mus spretus*. This specific genotype stems from an introgression on chromosome 7 of the house mouse by hybridization of the house mouse with the Algerian mouse (*Mus spretus*)<sup>19</sup>. This genotype was described for the first time in house mice trapped in Westphalia in Germany<sup>18,23</sup>. Since, then *Vkorc1*<sup>SPR</sup> introgressed house mice were detected in diverse geographical areas of Germany, Switzerland<sup>9,18</sup> and Spain<sup>18</sup>. In Spain, 93% of the house mice were reported to be carriers for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype<sup>18</sup>. In England, Italy and Greece, no *Vkorc1*<sup>SPR</sup> introgressed house mouse were detected. In France, the presence of such mice was previously unknown. Nevertheless, France is localized between Germany and Spain where *Vkorc1*<sup>SPR</sup> introgressed mice were found.

Moreover, in southern France, the co-existence of *Mus musculus domesticus* with *Mus spretus* is described<sup>24</sup>. It is thus not surprising that *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed house mice are present in France. These mice were captured in a French bakery invaded by mice despite the use of different anticoagulant rodenticides in the last 6 months (*i.e.*, baits with 50 ppm of bromadiolone or 50 ppm of brodifacoum). Resistance to rodenticides of this population of mice was suspected and *in vivo* tested by no-choice feeding trials.

Despite a consumption of coumatetralyl or chlorophacinone 8 to 10-fold higher than their LD50, no mortality of *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed female mice was observed in our study and only 20% and 50% of male mice died after consumption of 6-fold the LD50 of coumatetralyl or chlorophacinone. This resistance to coumatetralyl is in agreement with the results reported for a population of *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed mice trapped in Germany<sup>18</sup>. The first generation AVKs such as coumatetralyl and chlorophacinone can be thus considered as inefficient to control the populations of *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed mice, even if males seem to be less resistant than females. Bromadiolone and difenacoum, belonging to second generation molecules, seem also ineffective for controlling the populations of *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed mice, particularly to control females. No female was found dead after the consumption of 10-fold the LD50 of bromadiolone, as described for the *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed mice trapped in Germany<sup>18</sup> and only 80% of females were found dead after consumption of 5.5 mg.kg<sup>-1</sup> of difenacoum for 4 days. The other second generation molecules (*i.e.*, difethialone, brodifacoum and flocoumafen) were efficient to control *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed mice. Consumption of only 4-fold the LD50 of difethialone (*i.e.*, 1.9 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> for 4 days) leads to 100% mortality. For brodifacoum and flocoumafen, 100% mortality was obtained with highest concentrations (*i.e.*, 2.8 and 7.8 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> for 4 days) of active substance consumed. However, low concentrations of brodifacoum or flocoumafen were not tested because commercial ready baits containing less than 50 ppm of active substance were not available.

To further the understanding of resistance, we compared the observed phenotype with the properties of liver microsomal VKOR activity. The  $K_i$  towards first generation molecules and bromadiolone for liver microsomes of *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed mice were almost 10- to 100-fold higher than those obtained for liver microsomes of *VkorcI<sup>dom</sup>* mice (Fig. 1), while  $K_i$  towards second generation molecules such as difethialone, brodifacoum and flocoumafen were very similar between genotypes. These results are coherent with the *in vivo* phenotype of the *VkorcI<sup>SPR</sup>* introgressed mice. Such a demonstration of the coherence between the properties of the VKOR activity and the *in vivo* resistance phenotype to AVKs was first

performed by Lasseur et al<sup>17</sup> and Grandemange<sup>16</sup> et al for the Y139F mutation detected in *Vkorc1* of *Rattus norvegicus*.

To demonstrate the involvement of the four introgressed SNPs in the VKOR activity measured in the liver of *Vkorc1*<sup>SPR</sup>-introgressed mice, we produced yeast expressing either *Vkorc1*<sup>dom</sup> or *Vkorc1*<sup>SPR</sup> and determined resistance factor. This resistance factor corresponded to the ratio of  $K_i$  obtained for yeast microsomes expressing *Vkorc1*<sup>SPR</sup> with  $K_i$  obtained for yeast microsomes expressing *Vkorc1*<sup>dom</sup>. Clearly, the four SNPs modified the resistance to first generation AVKs of the VKORC1 enzyme and these modifications are similar to the modifications obtained for liver microsomes. The use of recombinant VKORC1 enzymes gave direct information about the catalytic properties of VKOR activity of the liver which is clearly linked to the *in vivo* resistance phenotype. This study is a supplementary demonstration revealing that the *in vitro* characterization of microsomal VKOR activity in yeast or in liver by the DTT-driven VKOR assay perfectly reflected the *in vivo* phenotype when no other mutation than the mutation or SNP in *Vkorc1* gene is involved in the resistance.

Indeed, additional genetically based mechanisms could contribute to the physiological response to AVK exposure and the presence of numerous fragments of the *Mus spretus* genome in the introgressed *Mus musculus* genome<sup>19</sup> could be associated to resistance. Altered expression of several cytochromes<sup>4,5,7</sup> was proposed to mediate or be involved in resistance to AVK. The concentrations of AVK molecules in the liver of *Vkorc1*<sup>SPR</sup> introgressed mice and *Vkorc1*<sup>dom</sup> mice were similar, suggesting no difference between expressions of cytochromes genes between genotypes. All these observations taken together are in favor of the exclusive involvement of the *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype in the *in vivo* resistance phenotype observed. Nevertheless, in the absence of a 3D-structure of VKORC1 enzymes of *Mus musculus domesticus* and *Mus spretus*, it is difficult to understand the structural consequences of the four introgressed SNPs and thus the consequences of these SNPs on the binding of first generation, while binding of second generation AVKs seems to be not modified by these SNPs.

The characterization of VKOR activity allowed also determining the consequences of the four introgressed SNPs for the efficiency of the enzyme to reduce vitamin K epoxide in vitamin K quinone. These SNPs lead to an enzyme with an altered enzymatic efficiency (i.e.,  $V_{max}/K_m$ ) compared to *Vkorc1*<sup>dom</sup> mice, thus reduce the efficiency of the vitamin cycle and consequently increase the vitamin K intake requirements for mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype. This decreased enzymatic efficiency is not in favor of an adaptation of these mice to a granivorous



vitamin K-deficient diet<sup>18</sup>. On the other hand, *Mus spretus* could be exposed to plants containing natural coumarin derivatives such as ferulenol contained in *Ferula communis* found exclusively in the Mediterranean basin<sup>25,26</sup> and the molecular evolution of *Vkorc1* in *Mus spretus* could result from this exposure.

The results presented demonstrate the necessity of using the most powerful second generation molecules such as difethialone, brodifacoum or flocoumafen to control populations of *Vkorc1*<sup>SPR</sup> introgressed mice. The use of first generation molecules on a site where *Vkorc1*<sup>SPR</sup> introgressed mice are present even with low frequency would promote the build-up of the *Vkorc1*<sup>SPR</sup> allele in this population, thereby increasing the frequency of homozygous animals from initially rare to ultimately very common. Nevertheless, the first generation molecules are environmentally safe and should be favored when absence of resistance is demonstrated. This demonstration could be made by preliminary genotyping. In this case, evaluation of resistance induced by single or combined mutation(s) to anticoagulant molecules seems to be crucial. In mice, a large number of SNPs was already identified p.E37G, p.R58G, p.W59G, P.W59L, p.W59S, p.L124Q, p.L128S, p.Y139C<sup>8,9,17,23</sup>, but resistance associated to these SNPs has not been fully characterized, except now for *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype. Detection of SNPs or mutations on the *Vkorc1* gene does not always mean resistance to AVK. Indeed, in humans, more than 26 missense mutations of the *VKORC1* gene have been found, but only 6 mutations lead to severe resistance to AVK<sup>10</sup>. Therefore, consequences of *Vkorc1* SNPs or mutations detected in rodents, and especially in mice, should be characterized in order to use the most appropriate AVK.

## 5 CONCLUSION

The present study demonstrates the existence of *Vkorc1*<sup>SPR</sup> genotype introgressed house mice in France. The *in vivo* characterization performed in this study will allow in the future targeting the appropriate molecules when this specific genotype is detected. Indeed, mice are totally resistant to the first generation AVK and only the use of the most powerful second generation AVK will control populations. This resistance phenotype was shown in this study to be exclusively due to the presence of the four introgressed SNPs p.R12W, p.A26S, p.A48T and p.R61L in *Vkorc1*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

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

## REFERENCES

1. Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C. & Watzka, M. The vitamin K cycle. *Vitam. Horm.* **78**, 35–62 (2008).
2. Li, T., Chang, C.-Y., Jin, D.-Y., Lin, P.-J., Khvorova, A. & Stafford, D. W. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* **427**, 541–544 (2004).
3. Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H.-J., Lappégard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E. G. D., Müller, C. R., Strom, T. M. & Oldenburg, J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* **427**, 537–541 (2004).
4. Sugano, S., Kobayashi, T., Tanikawa, T., Kawakami, Y., Kojima, H., Nakamura, K., Uchida, A., Morishima, N. & Tamai, Y. Suppression of CYP3A2 mRNA expression in the warfarin-resistant roof rat, *Rattus rattus*: possible involvement of cytochrome P450 in the warfarin resistance mechanism. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **31**, 399–407 (2001).
5. Ishizuka, M., Okajima, F., Tanikawa, T., Min, H., Tanaka, K. D., Sakamoto, K. Q. & Fujita, S. Elevated Warfarin Metabolism in Warfarin-Resistant Roof Rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 62–66 (2007).
6. 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 gamma-carboxylation. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **21**, 373–381 (2007).
7. 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. *Pest Manag. Sci.* **64**, 239–248 (2008).
8. Pelz, H.-J., Rost, S., Hünerberg, M., Fregin, A., Heiberg, A.-C., Baert, K., MacNicoll, A. D., Prescott, C. V., Walker, A.-S., Oldenburg, J. & Müller, C. R. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* **170**, 1839–1847 (2005).



9. Pelz, H.-J., Rost, S., Müller, E., Esther, A., Ulrich, R. G. & Müller, C. R. Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Manag. Sci.* **68**, 254–259 (2012).
10. 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.* **515**, 14–20 (2011).
11. Watzka, M., Geisen, C., Bevans, C. G., Sittinger, K., Spohn, G., Rost, S., Seifried, E., Müller, C. R. & Oldenburg, J. Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 109–118 (2011).
12. Hodroge, A., Matagrín, B., Moreau, C., Fourel, I., Hammed, A., Benoit, E. & Lattard, V. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J. Thromb. Haemost. JTH* **10**, 2535–2543 (2012).
13. Goulois, J., Chapuzet, A., Lambert, V., Chatron, N., Tchertanov, L., Legros, L., Benoît, E. & Lattard, V. 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.* (2015). doi:10.1002/ps.4020
14. Czogalla, K. J., Biswas, A., Wendeln, A.-C., Westhofen, P., Müller, C. R., Watzka, M. & Oldenburg, J. Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces. *Blood* **122**, 2743–2750 (2013).
15. Tie, J.-K., Jin, D.-Y., Tie, K. & Stafford, D. W. Evaluation of warfarin resistance using transcription activator-like effector nucleases-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells. *J. Thromb. Haemost. JTH* **11**, 1556–1564 (2013).
16. Grandemange, A., Kohn, M. H., 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* **19**, 742–750 (2009).
17. 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.* **19**, 379–385 (2005).
18. Song, Y., Endepols, S., Klemann, N., Richter, D., Matuschka, F.-R., Shih, C.-H., Nachman, M. W. & Kohn, M. H. Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison

- resistance by hybridization between Old World mice. *Curr. Biol. CB* **21**, 1296–1301 (2011).
19. Liu, K. J., Steinberg, E., Yozzo, A., Song, Y., Kohn, M. H. & Nakhleh, L. Interspecific introgressive origin of genomic diversity in the house mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 196–201 (2015).
  20. Moroni, P., Longinsauvageon, C. & Benoit, E. 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 (1995).
  21. Bradford, M. M. 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 (1976).
  22. Lefebvre, S., Rannou, B., Besse, S., Benoit, E. & Lattard, V. Origin of the gender differences of the natural resistance to antivitamin K anticoagulants in rats. *Toxicology* **344–346**, 34–41 (2016).
  23. Rost, S., Pelz, H.-J., Menzel, S., MacNicoll, A. D., León, V., Song, K.-J., Jäkel, T., Oldenburg, J. & Müller, C. R. 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 (2009).
  24. Britton, J. & Thaler, L. Evidence for the presence of two sympatric species of mice (genus *Mus* L.) in southern France based on biochemical genetics. *Biochem. Genet.* **16**, 213–225 (1978).
  25. Aragno, M., Tagliapietra, S., Nano, G. M. & Ugazio, G. Experimental studies on the toxicity of *Ferula communis* in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **59**, 399–402 (1988).
  26. Louvet, M.-S., Gault, G., Lefebvre, S., Popowycz, F., Boulven, M., Besse, S., Benoit, E., Lattard, V. & Grancher, D. 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 (2015).

## LEGENDS OF FIGURES

**Figure 1.** Inhibition effect of various anticoagulants on VKOR activity catalysed by yeast microsomes expressing VKORC1<sup>SPF</sup> or by liver microsomes of *Vkorc1*<sup>SPF</sup> genotype introgressed house mice, compared to the effect measured in yeast microsomes expressing VKORC1<sup>dom</sup> or by liver microsomes of mice carriers for wild type *Vkorc1*.

Bait containing : LD50 (mg/kg)	MALES				FEMALES			
	Total consumption of active substance (µg/mouse for 4 days)	Mortality (%)	Mortality interval (days)	Total consumption of active substance (µg/mouse for 4 days)	Mortality (%)	Mortality interval (days)		
Coumatetralyl	15-30	3240 (27 mg/kg/day)	20	4 to 7	3559 (31.8 mg/kg/day)	0	-	
Chlorophacinone	3.15	574 (4.8 mg/kg/day)	50	3 to 4	844 (7.5 mg/kg/day)	0	-	
Bromadiolone	1.75	639 (5.3 mg/kg/day)	60	4 to 7	501 (4.5 mg/kg/day)	0	-	
Difenacoum	0.8	453 (3.8 mg/kg/day)	100	4 to 7	618 (5.5 mg/kg/day)	80	7 to 14	
Difethialone	1.9	237 (1.9 mg/kg/day)	100	4 to 7	294 (2.6 mg/kg/day)	100	7 to 14	
Brodifacoum	0.4	333 (2.8 mg/kg/day)	100	4 to 9	471 (4.2 mg/kg/day)	100	7 to 11	
Flocoumafen	0.54	930 (7.8 mg/kg/day)	100	4 to 10	904 (8.1 mg/kg/day)	100	7 to 14	

**Table 1: Consumption of active substance and mortality of house mice homozygous for *VkorcI*<sup>SP1</sup> genotype during a no-choice feeding test with various AVKs.**

Bait containing :	[AVK] in liver of mice with <i>Vkorc1</i> <sup>dom</sup>	
	[AVK] in liver of mice with <i>Vkorc1</i> <sup>SPR</sup>	
	Male	Female
Difenacoum (50 ppm)	0.21	0.96
Difethialone (25 ppm)	0.88	1.06
Brodifacoum (50 ppm)	1.31	1.00

**Table 2: Ratio of AVK residues in liver of house mice homozygous for *Vkorc1*<sup>dom</sup> and house mice homozygous for *Vkorc1*<sup>SPR</sup>, that died during no-choice feeding tests.**

		$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ ( $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	$V_{\max}/K_m$ ( $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
Male	<i>VkorcI</i> <sup>SPR</sup> / <i>VkorcI</i> <sup>SPR</sup>	22.8 ± 9.6	33.4 ± 4.0	1.46
	<i>VkorcI</i> <sup>dom</sup> / <i>VkorcI</i> <sup>dom</sup>	13.6 ± 2.0	54.8 ± 1.0	4.02
Female	<i>VkorcI</i> <sup>SPR</sup> / <i>VkorcI</i> <sup>SPR</sup>	34.9 ± 15	53.6 ± 8.1*	1.14
	<i>VkorcI</i> <sup>dom</sup> / <i>VkorcI</i> <sup>dom</sup>	16.8 ± 3.8	151 ± 9.3	8.99

**Table 3. Apparent kinetic parameters towards vitamin K1 epoxide for VKOR activity in liver of house mice homozygous for *VkorcI*<sup>SPR</sup> genotype or homozygous for *VkorcI*<sup>dom</sup> genotype. \* p<0.05 compared to the corresponding data obtained for liver of female mice homozygous for *VkorcI*<sup>dom</sup> genotype.**

	MALES		FEMALES	
	$VkorcI^{spr}/VkorcI^{spr}$ (nM)	$VkorcI^{dom}/VkorcI^{dom}$ (nM)	$VkorcI^{spr}/VkorcI^{spr}$ (nM)	$VkorcI^{dom}/VkorcI^{dom}$ (nM)
Coumatetralyl	662 ± 31	35 ± 2.5 <sup>**</sup>	955 ± 487	38 ± 4 <sup>*</sup>
Chlorophacinone	354 ± 28	26 ± 1.5 <sup>**</sup>	572 ± 159	44 ± 1 <sup>*</sup>
Bromadiolone	247 ± 17	36 ± 3.1 <sup>**</sup>	387 ± 150	28 ± 4
Difenacoum	92 ± 32	17 ± 2.1	96 ± 35	30 ± 3
Difethialone	70 ± 8	21 ± 2.9 <sup>*</sup>	32 ± 11	50 ± 7
Brodifacoum	76 ± 16	25 ± 3.3 <sup>*</sup>	51 ± 23	38 ± 6
Flocoumafen	28 ± 5	7.2 ± 1.2 <sup>*</sup>	13 ± 4	10 ± 2.1

**Table 4:  $K_i$  values towards various AVK obtained with liver microsomes of house mice homozygous for  $VkorcI^{spr}$  genotype or homozygous for  $VkorcI^{dom}$  genotype.** Comparison between genotypes was done by using Mann-Whitney test. <sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$  or <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  compared to the corresponding data obtained for liver of male mice homozygous for  $VkorcI^{dom}$  genotype. Comparison of  $K_i$  between molecules within the same genotype was done by using Kruskal-Wallis test.  $K_i$  were found to be statistically different between molecules ( $p < 0.01$ ) within  $VkorcI^{spr}$  genotype or  $VkorcI^{dom}$  genotype.

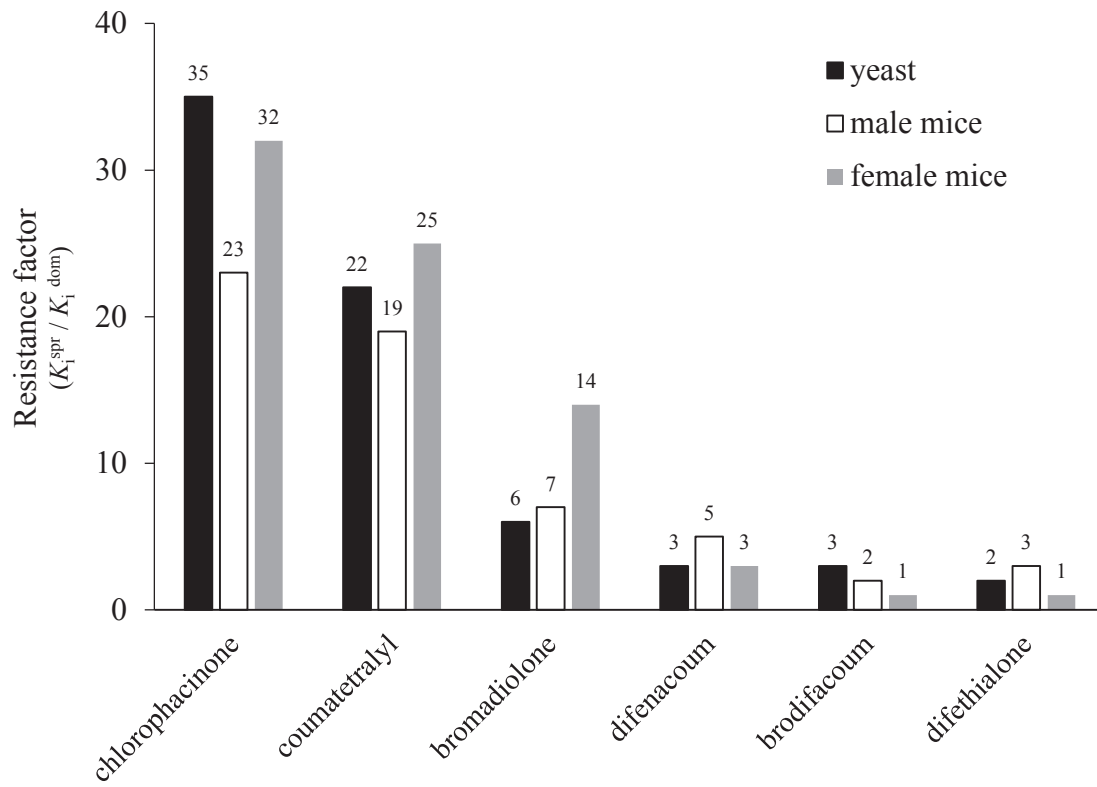


Figure 1



2. Etude *in vitro* du rôle de chacune des 4 mutations ponctuelles impliquées dans la *vkorc1 spretus* et étude de l'interaction de ces mutations ponctuelles dans le phénotype résistant de *VKORC1 spretus*

Ce travail fait l'objet d'une publication en cours de rédaction.

## **IV. Etude de la mutation W59G et de son implication dans le phénotype de résistance.**

### **A. Objectif :**

Plusieurs mutations sont décrites chez le rat brun comme étant responsables d'une perte partielle ou totale de l'activité de VKORC1. De plus, chez le rat brun, ainsi que chez l'homme, une mutation en position 59 sur VKORC1 engendre une VKORC1 inactive. Lors du projet Ratail, nous avons découvert des souris possédant la mutation W59G. L'objectif de cet article était d'étudier quelles étaient des conséquences de la mutation W59G sur la VKORC1 de souris. Dans le cas où cette enzyme serait elle aussi inactive, le second objectif était de comprendre comment ces souris pouvaient survivre.

### **B. Méthode :**

La protéine VKORC1 59G a été exprimée en levure *Pichia pastoris* et ses propriétés catalytiques ont été étudiées. Des souris W59G ont été piégées sur le terrain et nous avons créé une lignée de souris W59G dans notre animalerie. Un test avec de la warfarine a été réalisé afin de caractériser le phénotype de résistance de ces souris aux AVKs de première génération. Enfin, après euthanasie, les foies des souris homozygotes pour cette mutation, ont été prélevés. Les ARNm hépatiques ont été préparés ainsi que des microsomes de foie afin de tester d'une part l'activité VKOR des souris homozygotes 59G en utilisant 6 AVKs, et d'autre part afin de quantifier les niveaux d'expression des gènes *vkorc1* et *vkorc1L1*.

### **C. Résultats :**

Tout d'abord, l'enzyme VKORC1 59G exprimée en levure est inactive. Ainsi, cette mutation rend l'enzyme non fonctionnelle. De plus, les ARNm de *vkorc1* chez les souris homozygotes 59G sont très peu transcrits. Chez ces souris, il y a conjonction entre un gène *vkorc1* muté peu transcrit et une protéine qui apparaît, après expression hétérologue, inactive. Cependant, les souris homozygotes 59G survivent et se reproduisent très bien. De façon surprenante, nous avons observé une activité hépatique VKOR semblable à celle des souris WT. Ces souris possèderaient donc une autre enzyme que VKORC1 permettant de catalyser l'activité VKOR. Après avoir fait le test à la warfarine *in vivo* et testé l'activité VKOR vis-à-vis des 6 AVKs, nous avons constaté que les souris homozygotes 59G présentent une

résistance moyenne aux AVKs de première génération, en revanche, elles ne présentent pas de résistance aux AVKs de seconde génération.

Nous avons voulu tester l'hypothèse que l'enzyme paralogue de VKORC1, normalement peu exprimée dans le foie mais surtout exprimée dans les tissus extra-hépatiques, VKORC1L1 pourrait être impliquée dans la suppléance du gène *vkorc1* observée dans cette lignée. Le niveau d'expression des ARNm de *vkorc1L1* chez les souris 59G est semblable à celui des souris WT. De ce fait, VKORC1L1 n'est pas l'enzyme responsable de l'activité VKOR chez les souris 59G.

Ce travail est en cours de rédaction.

**Is the vitamin K epoxide reductase activity of mice homozygous for the W59G mutation in *vkorc1* gene catalyzed by an alternative enzyme than VKORC1 ?**

Joffrey Goulois<sup>1,2</sup>, Etienne Benoit<sup>1</sup> and Virginie Lattard<sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup> Liphatech, Bonnel, 47480 Pont du Casse, France

\*To whom correspondence should be addressed

**Key-words:** VKORC1, mutations, anticoagulant rodenticides, VKOR activity

Corresponding author

Dr Virginie Lattard

USC 1233 INRA-Vetagro Sup

69280 Marcy l'Etoile, France

Phone: +33-(0)4 78 87 27 27

Email: [virginie.lattard@vetagro-sup.fr](mailto:virginie.lattard@vetagro-sup.fr)

**Running title:** Another pathway for VKOR activity

## INTRODUCTION

Rodents are the cause of many economic and health problems. Indeed, they are reservoirs of over 40 zoonotic pathogens such as Leptospirosis or Hantaviruses. Moreover, they destroy every year about 200 million tons of cereal. So, the management of rodent populations is a major challenge. The most commonly used rodenticides are the vitamin K antagonist (VKA). The use of VKA for the management of rodent populations is practiced for over 50 years. These VKA have many advantages. Their delayed action allows to bypass food aversion which is a specific behavioral trait of rodents. A specific and immediate antidote in case of poisoning which is the vitamin K1 is available. VKA inhibit a key enzyme of the vitamin K cycle : the VKORC1 enzyme, encoded by the *vkorc1* gene (1,2). This enzyme allows to catalyze the reduction reaction of vitamin K epoxide in vitamin K hydroquinone. The presence of vitamin K hydroquinone is essential for the production of clotting factors (II, VII, IX and X). Thus, the inhibition of VKORC1 by the VKA, blocks the recycling of the vitamin K hydroquinone, and rodents die from bleeding.

However, after 50 years of intensive treatment, resistance cases have been reported, initially in rats (3), then in mice (4). On one hand, the resistance may be of metabolic origin. This metabolic resistance was notably observed in *Rattus rattus* (5,6). On the other hand, the resistance can be due to a modification of the target. The target resistance corresponds to a decrease of the inhibiting effect of VKA towards the VKOR activity. This target resistance is due to the selection of mutations in the *vkorc1* gene. Numerous mutations have been detected in this gene and associated with a resistant phenotype in *Rattus norvegicus* (7,8), in *Mus musculus domesticus* (7,9) and also in humans (10,11). The use of recombinant VKORC1 expressed in yeast is a reliable tool for studying the resistance associated with *vkorc1* mutations (8,11,12). Hodroge et al have shown a correlation between the use of recombinant enzymes expressed in yeast and the results observed *ex vivo* and *in vivo* (8).

By using this methodologic approach, Hodroge et al showed that all the *vkorc1* mutations are not systematically causal for resistant phenotype (11). So in humans, among 30 mutations, only 6 led to clear resistance. The mutation R98W, leads to inactivation of the VKORC1 protein. This mutation was detected in the homozygous state in lebanese families and the mutation R98W is responsible for VKCFD2 syndrome. Ten other mutations whose W59R W59L and W59C mutations, could also lead to a protein with a basal activity quite reduced (11). In fact, using recombinant yeast expression system, the VKOR activity of the W59

mutated VKORC1 is less than 2% of the VKOR activity of the wild type enzyme. These mutations are found in the heterozygous state in humans and they are not described to be associated with pathological consequences. However, the basal activity of these 10 human mutations remains controversial. Indeed, the expression of the corresponding proteins in a eukaryotic system would allow to still ensure the gamma-carboxylation of an overexpressed chimeric factor IX. The limiting step in this cell system being not described, the maximum activity of an overexpressed wild type VKORC1 in this system cannot be measured and therefore the effects of mutations on basal activity cannot be evaluated.

In mice, mutations in the tryptophan 59 amino acid have been also observed, the W59G, W59L and W59S mutations (Goulois et al, submitted). Furthermore, we have found in France, during a resistance monitoring study, mice carrying, in the homozygous state, the mutation W59G, in Marne, Finistere and Morbihan department. W59G Homozygous mice were trapped and a strain has been developed to evaluate the resistance of these mice and to identify the underlying mechanisms.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Warfarin-susceptible and warfarin-resistant wild mice strains, bred in VetAgro Sup, were initially trapped from French farms in the 1980s. Each strain received the same feed and water *ad libitum*. Animals were not supplemented in vitamin K and received a standard feed (Scientific Animal Food and Engineering, reference A04 for adult rodent).

### **No-choice feeding test with warfarin**

Before testing, all animals were maintained on diet A04 (Scientific Animal Food and Engineering) and water *ad lib*. Individuals were weighed before the start of the test. No-choice feeding tests were carried out on groups of twenty mice. Mice were fed with wheat containing 0.025% warfarin. Feeding periods of 6 or 9 days were used for male and female, respectively. The contents of food pots were weighed daily and the intake of bait recorded. The mortality of mice was also observed daily. At the end of the feeding period with toxic baits, animals were given diet A04 again and observed for an additional period of 15 or 12

days, for male and female, respectively. The criterion for resistance to warfarin was survival of a 21-day feeding test on 0.025% warfarin bait.

### ***Vkorc1* sequencing**

Genomic DNA was extracted from tail sample using the Macherey-Nagel Nucleo-spin Tissue extraction kit (Hoerd, France). Two  $\mu$ l of genomic DNA was amplified using specific primers of *Vkorc1* gene. In order to sequence the totality of the *Vkorc1* gene, two sets of primers were used. The sequences of the first set of primers sVKOR-S1 and sVKOR-AS1 were (5'-GATTCTTCCCTCCTGTCC-3') and (5'-AGACCCTGTCTCAAAACCTA-3'), respectively, and were used to amplify mouse *Vkorc1* gene from nucleotide -36 to nucleotide +1727. The sequences of the second set of primers sVKORC1-S2 and sVKORC1-AS2 were (5'-GAAAGCAGAACAACCTTAGCAGG-3') and (5'-AACCAACAGCAGAATGCAGCC-3'), respectively, and were used to amplify the mouse *Vkorc1* gene from nucleotide (+)1252 to nucleotide (+)2512. Mouse *Vkorc1* amplifications were performed using sVKOR-S1 and sVKOR-AS1 or sVKOR-S2 and sVKOR-AS2 (10 pmol), Accuprime polymerase (1 units, Invitrogen) in a 25  $\mu$ l reaction volume containing 2  $\mu$ l DNA, 2.5  $\mu$ l 10X Accuprime buffer and 200  $\mu$ M of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94°C for 3 min followed by 40 cycles at 94°C for 20 s, 64°C for 20 s, 68°C for 50 s, and a final extension step at 68°C for 10 min. The amplified products were sequenced on both strands.

### **DNA mutation screening assay**

The VKORC1 exons 1, 2 and 3 from the 250 mouse samples were sequenced (Biofidal, Lyon, France). The sequences were read with Bioedit software. They were analyzed using clc sequence viewer 7 software and compared to published *Mus musculus domesticus* sequences published in Genbank in order to detect the homozygous mutations. The heterozygous mutations were detected by examination of the sequencing chromatogram.

### **Plasmid constructions**

*Mus musculus VKORC1* coding sequence fused with a c-myc tag *via* a flexible (GGG)<sub>3</sub> in its 3'-extremity was optimized for heterologous expression in yeast and synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA). Synthesized nucleotide sequences included EcoRI and



XbaI restriction sites at their 5'- and 3'-extremities, respectively. These nucleotide sequences were subcloned into pPICZ-B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and sequenced on both strands. Construction of VKORC1-G59 was carried out using pPICZ-mVKORC1 as template, with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Mutant was checked by sequencing, and the mutant was expressed in *P. pastoris*.

### **Heterologous expression in *Pichia Pastoris***

Heterologous expressions of mVKORC1 and G59-VKORC1 proteins were performed in *Pichia pastoris* as described previously (4, 15). pPICZ-mVKORC1 or G59-VKORC1 vectors were individually transformed into the *P. pastoris* SMD1168 yeast strain using the *P. pastoris* Easy Comp Transformation kit (Invitrogen). Transformants were selected on YPD plates (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose) containing 100 µg/ml Zeocin (Invitrogen). The cells were grown in BMGY medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, and 1% (v/v) glycerol). Expression was induced by methanol (1%, v/v) for 48 h at 30 °C in a rotary shaker (200 rpm). Yeast cells were collected by centrifugation (3000 g – 10 min) and immediately frozen at -20°C.

### **Subcellular fractionation of recombinant yeast cells**

Yeast microsomes were prepared from thawed yeast cells by differential centrifugation. Briefly, yeast cells were resuspended in 50 mM Phosphate Buffer (pH 7.4) containing 1.15 % (w/v) of KCl. Yeast cells were broken with Zircon beads using Dispermat<sup>®</sup> LC30 (VMA-GETZMANN, germany) (15 min – 3500 rpm) a continuously at 4°C and further submitted to differential centrifugation. The 100,000 g pellet corresponding to the membrane fraction was resuspended by Potter homogenization in HEPES glycerol buffer (50 mM Hepes, 20% glycerol, pH 7.4). Protein concentrations were evaluated by the method of Bradford using bovin serum albumin as a standard. Microsomes were frozen at -80°C and used for kinetic analysis.

### **Immunoblot analysis**

Expression level quantification of mVKORC1 and G59-VKORC1 proteins in microsomal fractions were determined by western blotting. Briefly, microsomal proteins were separated

on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto Immobilon-P membranes. The membrane were saturated with in a solution of 5% milk diluted in PBS buffer, and the membrane was incubated at 4 ° C overnight with anti-c-myc primary antibody (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). The resulting immunocomplexes were visualized using Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulins as secondary antibodies and the terminal detection was performed by incubating the membrane with an ECL RevelBlot® Intense solution (Ozyme) and revealed by chemiluminescence using the imager Syngene® (Ozyme). The relative intensity (RI) of the signal was correlated to the quantity of microsomal proteins. The relation was linear from 0 to 10 µg for microsomal proteins.

### **Vitamin K epoxide reductase activity (VKOR) assays and kinetics**

Microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity was assayed as described previously (4, 15). Briefly, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl, 1 mM dithiothreitol and 1 g.L<sup>-1</sup> of total proteins. The reaction was started by the addition of vit K1>O solution in 1% Triton X-100 and incubated at 37°C for 30 min. In these conditions, the reaction was linear according to the time of incubation and the quantity of incubated proteins. After incubation at 37°C for 30 min, the reaction was stopped by adding of 2 mL of isopropanol. After centrifugation at 3000 g for 10 min in order to precipitate proteins, 2 mL of hexane was added. After centrifugation at 3000 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.

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 (2.1mm × 50mm, 2.5µm, Waters, Milford, MA, USA) with a mobile phase of methanol, 0.1% acetic acid (96:4) in isocratic condition. The column temperature was 48°C. The flow rate in the LC column was 0.4ml/min. The injection volume was 20µl. 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 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 for vit K1 are the retention time (tr= 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.

$K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_i$  values were obtained from at least three separate experiments performed on two different batches of protein. The estimation of  $K_m$  and  $V_{max}$  values was achieved by the incubation of at least 9 different concentrations of vit K>O (from 0.003 to 0.2 mM) to the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis-Menten model using the R-fit program. In order to evaluate the inhibiting effect of AVKs on VKOR activity,  $K_i$  were determined after addition of various concentrations of anticoagulant (Fig. 3) to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vit K>O (from 0.003 to 0.2 mM) using anticoagulant concentrations from about 0.05 to  $20 \times K_i$ . Data were fitted by non-linear regression to the non-competitive inhibition model  $v = (V_{max}/(1+(I/K_i))) * (S/(K_m+S))$  using the R-fit program.

### **Total RNA extraction and cDNA synthesis**

Total RNA were extracted from mouse. first with the TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and then by using SV Total RNA Isolation System (Promega, Charbonnières, France). Three separated RNA extractions were made. 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 RNA in a final volume of 20  $\mu$ L containing 500 pmol of oligo(dT)<sub>18</sub> and 200 units of Moloney murine leukemia virus Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol.

### **Quantitative real time-PCR**

Quantitative real time-PCR reactions were performed with the MX3000P qPCR Machine (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) using primers for *Vkorc1*, *Vkorc1L1*, *Ggcx* or *Nqo1*. Sequences primers for *Vkorc1* amplification were 5'-TCCCGCGTCTTCTCCTCT-3' (forward) and 5'-CGTCCCCTCAAGCAACCTA-3' (reverse). Sequences primers for *Vkorc1L1* amplification were 5'-CGAGCCAAACAGTGTCTTTGGACTTA-3' (forward) and 5'-TGTGGTGACGCAGATGATGCAA-3' (reverse). *Gapdh* was used as housekeeping gene. Sequences of the *Gapdh* primers were as follows: 5'-CAGAACATCATCCCTGCATC-3'

(forward) and 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3' (reverse). The housekeeping gene was amplified under the same conditions used for the amplification of the target genes. Briefly, in a final volume of 20  $\mu$ 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 15 min and 40 cycles of amplification (95°C for 30s, 60°C for 40s and 72°C for 30s). To determine the specificity of amplification, analysis of product melting was conducted after the 40 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. In these conditions, *Vkorc1* and *Vkorc111* amplification efficiencies were similar (respectively, 101 and 99%) and allowed the comparison of their relative expression. 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 in duplicate, 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 ( $\Delta C_t = C_t \text{ target} - C_t \text{ control}$ ) and the relative concentration was determined with the following formula:  $2^{-\Delta C_t}$ .

## RESULTS

### **The wild mice from the colony of Lyon were effectively resistant to warfarin**

In order to evaluate the *in vivo* resistance to warfarin of the wild mice from the resistant colony of Lyon, a no-choice feeding test with warfarin was performed, as described in the experimental procedures. 128 mice including 59 males and 69 females from the resistant colony of Lyon were fed with wheat containing 0.025% warfarin for 6 and 9 days, for male and female, respectively. Twenty one days after the beginning of the test, 52 % of mice were alive (in comparison, a no-choice feeding test with such bait led to 98% of mortality in susceptible mice). *Vkorc1* gene was sequenced in the 128 mice used for the no-choice feeding test. Sequencing of *Vkorc1* gene allowed us to detect a single nucleotide mutation T969G. This mutation led to the replacement of Trp into Gly in position 59 of VKORC1. Table 1 presents the genetic status of the mice of the starting population and the genetic status of the mice dead and alive after the no-choice feeding test. In the starting population including 128 mice, the G59 allelic frequency was 36% with 14% of mice homozygous for G59, 44% of mice heterozygous and 42% of mice homozygous for W59 (i.e., carriers for wild-type *Vkorc1*

gene). In the population of surviving mice including 67 individuals, the G59 allelic frequency was 46% with 20% of mice homozygous for G59, 51% of mice heterozygous and 29% of mice homozygous for W59. In the population of dead mice including 61 individuals, the G59 allelic frequency was only 25% with 6% of mice homozygous for G59, 37% of mice heterozygous and 57% of mice homozygous for W59.

### **The resistance to warfarin of the mice from the colony of Lyon was linked to the presence of the W59G mutation**

In order to analyze the *in vivo* resistance to warfarin according to *Vkorc1* genetic status of the wild mice of the resistant colony of Lyon, twenty male and female mice of each genotype (i.e., homozygous for W59 or homozygous for G59 or heterozygous) were selected in the colony by the genotyping method described in the experimental procedures. Thus, the *in vivo* resistance to warfarin of each group of mice was evaluated by performing a no-choice feeding test, as described previously. Mortality results and mean bait consumption are presented in Table 2. Mean bait consumption during the feeding period was similar between groups. Twenty one days after the beginning of the test, 95% of male and 84% of female mice homozygous for G59 and 35% and 42% of male and female heterozygous mice were alive while only 10% of male and 5% of female mice homozygous for W59 were still alive.

### **W59G mutation led to an almost complete loss of VKOR activity**

To assess the consequences of W59G mutation on the functional properties of VKORC1, wild-type and its W59G-VKORC1 mutant were overexpressed as c-myc-fused proteins in *P. pastoris*. Both proteins were efficiently expressed in *Pichia pastoris* with the same expected molecular mass of approximately 20-kDa. Western blot analysis showed that recombinant wild-type and its W59G-VKORC1 mutant were expressed at similar levels (Figure 1). The expression factor of W59G-VKORC1 protein (comparatively to the expression of WT-VKORC1) was comprised between 0.8 to 1.5 (according to the batch of recombinant protein analyzed) (Figure 2). The ability of WT-VKORC1 and its W59G-VKORC1 mutant to catalyze the reduction of K<sup>></sup>O to K was determined. Figure 2 shows the VKOR activity of WT-VKORC1 and W59G-VKORC1 proteins at 200 μM of K<sup>></sup>O after normalization of their expression. W59G mutation led to an almost complete loss (>98%) of VKOR activity towards vit K<sup>1</sup>>O.

### **W59G mutation was linked to a very low expression of corresponding mRNA in liver**

The presence of mRNA for *Vkorc1* was assessed by real time PCR in liver from male mice from the resistant colony of Lyon, according to the *Vkorc1* genetic status. Figure 3 shows patterns of the expression of mRNA encoding VKORC1 but also the other enzymes involved in the vitamin K cycle (i.e., VKORC1L1, GGCX and NQO1) in liver from G59/G59 or W59/G59 or W59/W59 male mice from the resistant colony and in liver from male mice of the warfarin-susceptible colony. *Vkorc1* mRNA were detected in livers of all mice. Nevertheless, in liver from G59/G59 mice, expression of *Vkorc1* mRNA was drastically decreased

### **Liver microsomes of mice homozygous for G59 were able to catalyze VKOR activity**

In order to characterize the *in vitro* resistance to VKA of liver microsomes of mice homozygous for G59, 10 male mice homozygous for G59 and 10 male mice homozygous for W59 were selected in the resistant colony by the genotyping method. Moreover, 10 male mice from the warfarin-susceptible mice colony were also selected. Liver microsomes were prepared as described in the experimental procedures. The ability of each microsomal fraction to catalyze the reduction of K<sup>></sup>O to K was determined. Liver microsomes of mice homozygous for G59 was able to reduce vit K<sup>></sup>O in vit KH2 as liver microsomes of mice homozygous for W59. The reaction rates of microsomal fractions towards vit K<sub>1</sub><sup>></sup>O followed the Michaelis–Menten model allowing the determination of kinetic parameters. Results are presented in Table 3.  $K_m$  and  $V_{max}$  values obtained for liver microsomes of mice homozygous for G59 were similar to those obtained for liver microsomes of mice homozygous for W59.

### **VKOR activity catalyzed by liver microsomes of mice homozygous for G59 was resistant to warfarin**

In order to compare the susceptibilities to AVKs of the VKOR activity catalyzed by liver microsomes of mice homozygous for W59 and mice homozygous for G59, their respective inhibition constants  $K_i$  towards various AVKs of the first generation (i.e., warfarin, coumatetralyl, chlorophacinone) or the second generation (i.e., bromadiolone, difencoum, difethialone or brodifacoum) were determined. All AVKs were able to inhibit the VKOR activity in a non-competitive manner for all the mutants. Results are presented in Table 4. The VKOR activity catalyzed by liver microsomes of mice homozygous for G59 was highly

resistant to warfarin, coumatetralyl, chlorophacinone and bromadiolone compared to liver microsomes of mice homozygous for W59.

## **DISCUSSION AND CONCLUSIONS**

1/ Mice homozygous for W59G mutation are resistant to warfarin, as shown by the no choice feeding test. This result suggests that this mutation leads to a VKORC1 enzyme resistant to warfarin.

2/ In order to demonstrate the involvement of this mutation in the *in vivo* resistance phenotype observed for the mice carrier for this mutation, the recombinant mutated VKORC1 was expressed in *Pichia pastoris*. This recombinant enzyme was almost not able to catalyse the VKOR activity (less than 2% of VKOR activity compared to wild type VKORC1). Moreover, the *Vkorc1* mRNA was 10-fold less expressed in liver of mice homozygous for G59 than for W59. Therefore, VKORC1 cannot support the VKOR activity in liver in mice homozygous for G59.

3/ There is a VKOR activity in liver of mice homozygous for G59. This activity is resistant to warfarin. Another enzyme must exist in liver of these mice to support the VKOR activity.

4/ In order to identify the enzyme able to support the VKOR activity in liver of mice homozygous for G59, the corresponding gene will be introgressed in the genome of CD1 mice by successive crossings and selection by warfarin, as described in Figure 4.



## REFERENCES

1. 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 Feb 5;427(6974):541–4.
2. 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 Feb 5;427(6974):537–41.
3. Boyle CM. Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons. *Nature*. 1960 Nov 5;188(4749):517–517.
4. Dodsworth E. Mice are spreading despite such poisons as warfarin. *Minic Engin Lond*. 1961;
5. 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 Fate Foreign Compd Biol Syst*. 2001 Jul;31(7):399–407.
6. 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 Jan 1;35(1):62–6.
7. Pelz H-J, Rost S, Hünenberg M, Fregin A, Heiberg A-C, Baert K, et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*. 2005 Aug;170(4):1839–47.
8. 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 Nov;515(1-2):14–20.
9. 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 Feb 1;68(2):254–9.



10. Watzka M, Geisen C, Bevans 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 Jan 1;9(1):109–18.
11. 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 JTH*. 2012 Dec;10(12):2535–43.
12. 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*. 2015 Apr 7;

**Table 1: Characterization of the genotype of mice in the starting wild population and in the surviving and dead populations after a no-choice feeding test with baits containing 0.025% warfarin.**

population	n	genotype		
		W59/W59	W59/G59	G59/G59
Starting population	128	53	57	18
Surviving population	67	19	34	14
Dead population	61	34	23	4

**Table 2: Mortality of mice belonging to different strains with different *Vkorc1* genotype during a no-choice feeding test with baits containing 0.025% warfarin.**

To determine the susceptibility of mice to warfarin, a no-choice feeding test with a bait containing 0.025% of warfarin was carried out. For each group, 20 males or female mice were exposed to baits for 7 days (for male) or 9 days (for female).

Mice strain	Genotype	Male		Female	
		Mean bait consumption (g)	Mortality (%)	Mean bait consumption (g)	Mortality (%)
Warfarin-susceptible wild mice strain	W59/W59	99	100	142	95
	W59/W59	191	90	164	95
Wild mice from the resistant colony of Lyon	W59/G59	177	65	237	58
	G59/G59	163	5	286	16

**Table 3: Apparent kinetic parameters towards vit K1>O obtained with liver microsomes from wild mice belonging to different strains with different *Vkorc1* genotype.**

Liver microsomes were performed by using liver from 10 individuals of the strain. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of two individual determinations. \*  $p < 0.02$  compared to the values obtained for the warfarin-susceptible mice.

Mice strain	Genotype	Km ( $\mu$ M)	Vmax ( $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of prot)	Vmax/Km ( $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of prot)
Warfarin-susceptible mice strain	W59/W59	13.6 $\pm$ 1.4	24.8 $\pm$ 0.7	1.82
Wild mice from the resistant colony of Lyon	W59/W59	19.9 $\pm$ 2.3	32.6 $\pm$ 1.4	1.63
	G59/G59	17.9 $\pm$ 3.1	26.3 $\pm$ 0.9	1.46

**Table 4: Ki values towards various AVK obtained with liver microsomes from wild mice belonging to different strains with different *Vkorc1* genotype.**

Liver microsomes were performed by using liver from 10 male mice belonging to the same the strain. Inhibition parameters were assessed using anticoagulant concentrations from about 0.05 to  $20 \times K_i$ . Each data point represents the mean  $\pm$  SD of two individual determinations. \*  $p < 0.02$  compared to the values obtained for the warfarin-susceptible mice.

Inhibitor	Warfarin-susceptible mice strain	Wild mice from the resistant colony of Lyon	
	W59/W59	W59/W59	G59/G59
warfarin	0.36 $\pm$ 0.08	0.30 $\pm$ 0.05	27.0 $\pm$ 7.90 *
coumatetralyl	0.04 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	1.07 $\pm$ 0.27 *
chlorophacinone	0.03 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01 *
bromadiolone	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.08 *
difenacoum	0.02 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02
brodifacoum	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02
difethialone	0.02 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01

## Figure captions

**Figure 1: Semi-quantitative analysis of wild type VKORC1 and W59G-VKORC1 expressed in *Pichia pastoris* by western blotting.**

**Figure 2: Specific activity of wild type VKORC1 and its W59G mutants.** Enzyme activity was evaluated in the presence of 200  $\mu\text{M}$  of KOX and 0.25 to 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of microsomal proteins containing membrane WT or mutated VKORC1. Values are expressed as % of activity of WT-VKORC1. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three individual determinations and is representative experiment performed on two different batches of protein.

**Figure 3:** Expression of mRNA encoding VKORC1, VKORC1L1, GGCX, NQO1 and Calumenine in liver from G59/G59 or W59/G59 or W59/W59 male mice from the resistant colony and in liver from male mice of the warfarin-susceptible colony.

**Figure 4:** W59G mutation introgression in CD1 mice.

Figure 1  
WB levures

Figure 2  
yeast WT / 59G standardized specific activity

Figure 3

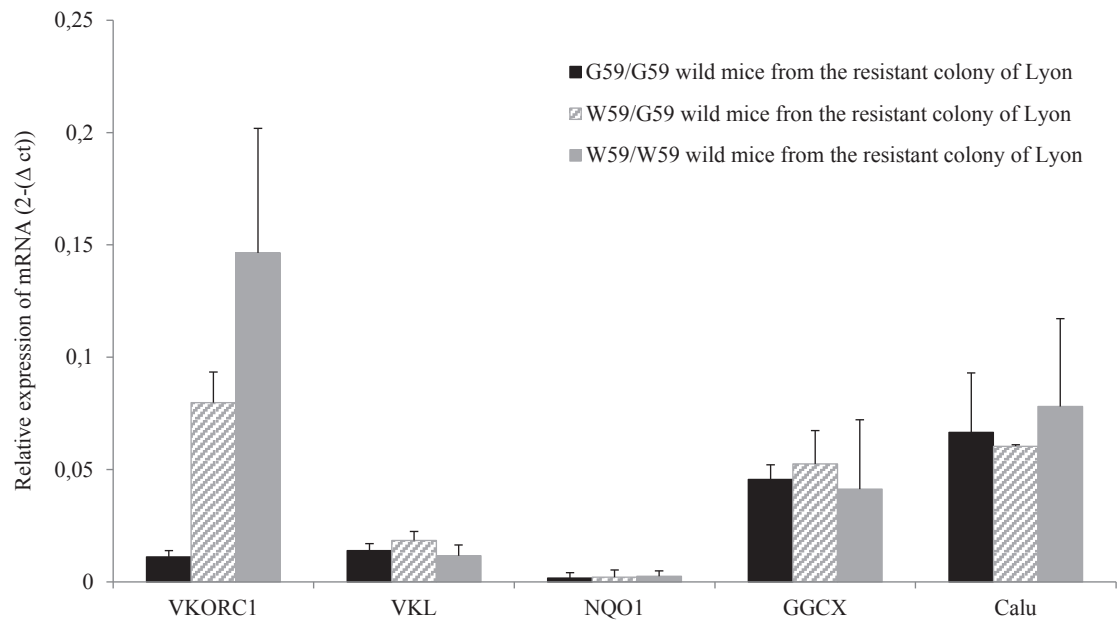
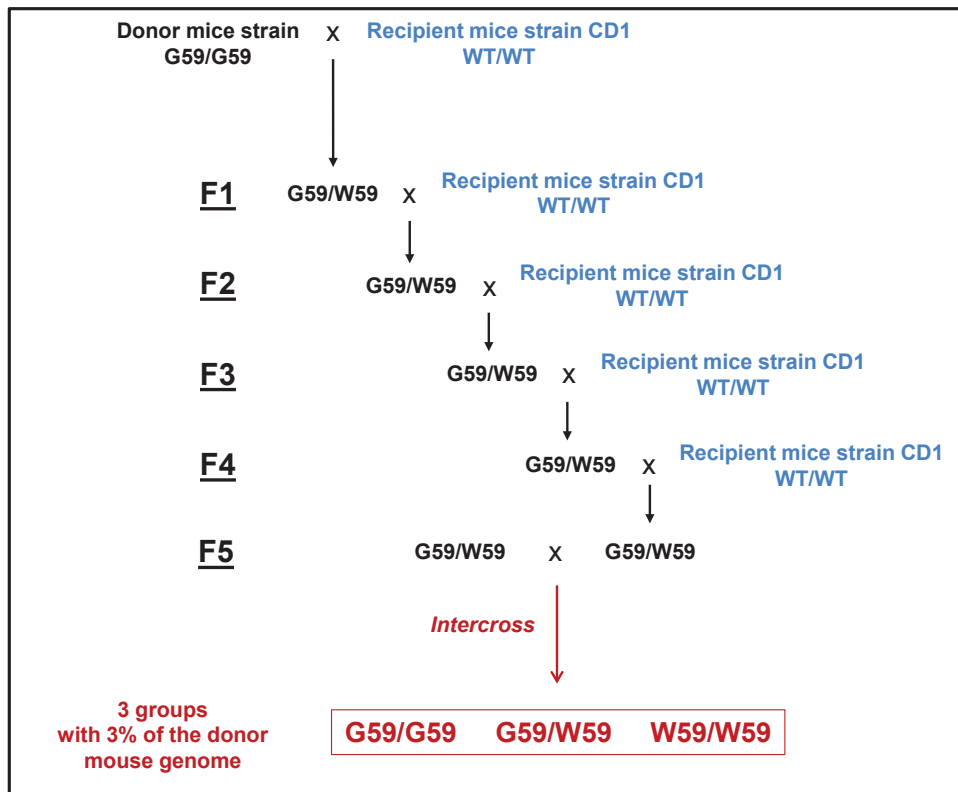


Figure 4



## ***Partie 7 : Discussion***

---

Le travail présenté dans ce mémoire traite des différents mécanismes de résistance de cible aux AVKs découverts chez *Mus musculus domesticus* mais aussi chez un autre rongeur considéré comme nuisible, le rat noir ou *Rattus rattus*. Depuis les années 60, les professionnels (PCO, pest control operators) ont observé sur le terrain que les souris avaient tendance à être moins sensibles aux traitements anticoagulants et plus difficiles à gérer. Alors que notre connaissance de la résistance de cible commençait à être importante pour le rat brun, *Rattus norvegicus* et que la résistance induite par ce mécanisme est particulièrement efficace, nous ne disposions, au début de ce travail que de très peu de données sur ce mécanisme chez d'autres rongeurs nuisibles. Nous avons voulu, par une étude de terrain, rechercher les mutations du gène *vkorc1* et évaluer l'importance de ce mode de résistance en France dans les populations de souris domestiques et de rats noirs et réaliser une surveillance de l'évolution de cette résistance chez le rat brun pour lequel nous connaissions les principales mutations retrouvées en France, Y139F (de loin la plus fréquente), Y139C et L120Q).

*Notre théorie de départ était que le mode de résistance aux AVKs chez la souris était identique à celui du rat brun, à savoir un nombre limité de SNP au niveau de l'exon 3 du gène vkorc1, induisant une perte de sensibilité importante aux anti-vitamines K. En effet, chez Rattus norvegicus, nous savons que 5 mutations sont réellement causales de la résistance : Y139C, Y139F, Y139S, L128Q et L128S. Ces mutations sont présentes en Europe et possèdent une répartition bien localisée dans chaque pays.*

### **Mise en place du projet Ratail et SNP découverts**

La thèse CIFRE a pour avantage de permettre de créer une passerelle entre le milieu de la recherche et le milieu industriel, dans le cas de cette thèse, l'entreprise Liphatech. Le projet Ratail est le fruit de cette association. Liphatech, grâce à son réseau étendu de PCO en France, nous a envoyé plus de 340 échantillons de rats bruns et de rats noirs et plus de 290 échantillons souris provenant de 27 régions en France. A partir de ces échantillons, nous avons extrait l'ADN génomique, amplifié et séquencé les 3 exons du gène *vkorc1*.



## **Importance du phénomène de résistance chez la souris domestique**

Cette étude nous a permis de découvrir un nombre important de mutations chez la souris, bien plus important que chez le rat brun et contrairement au rat brun, ces SNP sont présents sur les 3 exons du gène *vkorc1*. De plus, cette étude nous a dévoilé une très faible proportion de souris WT. Sur les 290 échantillons de souris envoyés, 70% de ces souris présentent une mutation sur leur séquence *vkorc1*, soit 30% de souris WT. Dans son étude en Allemagne, Pelz avait observé une proportion de souris WT encore plus faible, de l'ordre de 9%. Dans notre étude, les 290 échantillons proviennent de 65 sites. En effet, pour être représentatifs d'un site, plusieurs individus doivent être échantillonnés et analysés. Sur ces 65 sites, 4 sont dépourvus de mutation, soit 6% des sites. En Allemagne, la proportion de sites indemnes de mutation était de 4%. Nos résultats observés sont concordent donc avec ceux observés précédemment par Pelz *et al* en Allemagne. Enfin, en France, parmi les souris présentant des mutations, 80% expriment ces mutations à l'état homozygote. Cependant, la faible proportion de souris WT retrouvée dans notre étude peut être quelque peu biaisée par le fait que ce sont des PCO qui nous font parvenir les échantillons. En effet, les PCO nous envoient des échantillons provenant de zones qui ont été traitées par des AVKs. Or, nous savons depuis longtemps que l'utilisation des AVKs engendre une pression de sélection qui sélectionne justement les individus porteurs de mutations. Donc, selon les traitements effectués précédemment sur le site, en cas de premier traitement, la majorité des échantillons envoyés sera des souris WT. En cas de traitements répétés sur une longue période sur le site, la majorité des échantillons présentera une mutation.

Néanmoins, nos résultats montrent :

- Une extension massive de la résistance. Non seulement 70% des prélèvements que nous avons analysés sont mutés, mais des souris mutées sont aussi retrouvées dans plus de 90% des sites. De plus l'essentiel des mutations sont retrouvées à l'état homozygotes ce qui montre que dans les sites d'essais, la fréquence allélique de la mutation observée est très importante.
- Que le nombre des mutations est élevé. Il apparaît que ce nombre est bien plus important chez la souris domestique que chez le rat brun.
- Qu'il existe une répartition régionale des mutations et que dans un même site de piégeage il n'est retrouvé, en général, qu'une ou deux mutations.

Il ne fait guère de doute que l'utilisation intensive des AVKs en France durant les 50 dernières années, ait permis la sélection de populations résistantes et que la faible proportion de souris WT en est le reflet concret. Ces résultats correspondent avec les observations provenant des PCO qui soulignent une difficulté croissante à venir à bout d'une invasion de souris sur un site.

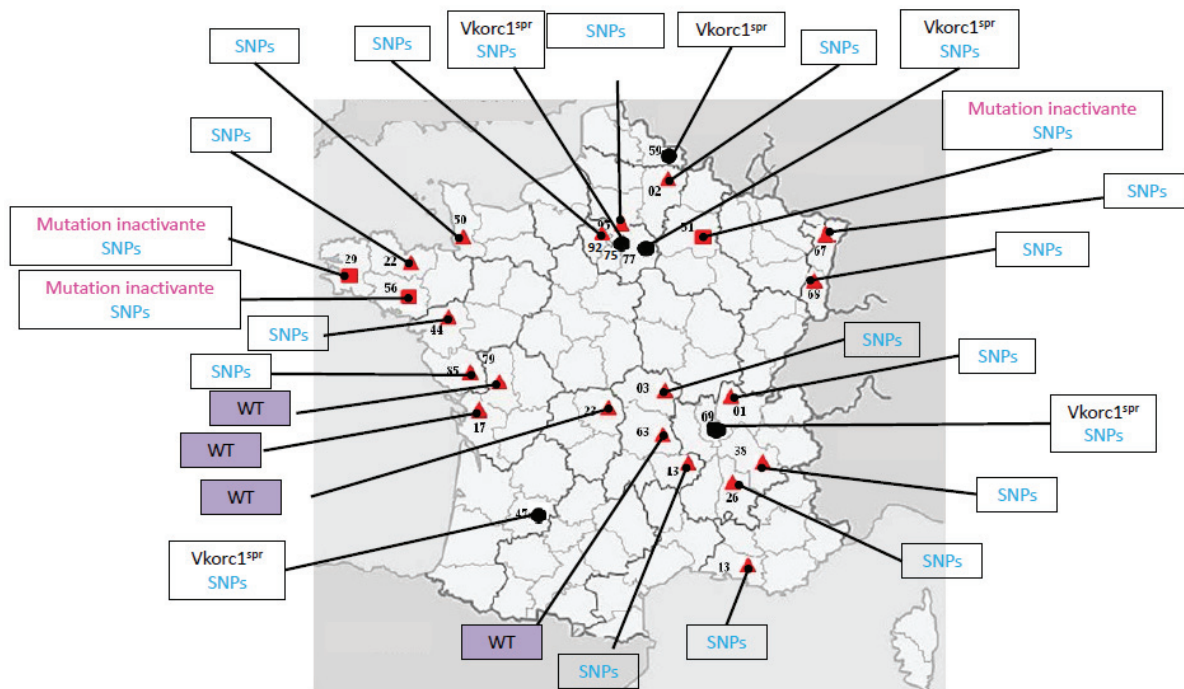


Figure 42 : Carte représentant les modes de résistance aux AVKs développés par les souris en France

Cette étude nous a permis de mettre en évidence 3 modes de résistance de cible aux AVKs chez la souris domestique en France (figure 42). Tout d'abord : des SNPs, qui comme chez *Rattus norvegicus*, peuvent affecter la sensibilité de VKORC1 aux traitements antivitaminé K. Ensuite, le second mode de résistance est l'introgession du gène *vkorc1* des *Mus spretus* chez les souris domestiques. Enfin, dans certains cas, une mutation sur le gène *vkorc1* aura pour conséquence d'inactiver l'enzyme VKORC1 : les mutations W59. Dans ce cas, la mise en place d'un autre gène permettra de réaliser l'activité VKOR. L'étude des 3 modes de résistance a été réalisée en étudiant les propriétés catalytiques des enzymes VKORC1 mutées exprimées par la levure recombinante *Pichia pastoris*.

## Caractérisation des mutations par un modèle d'expression hétérologue en levure *Pichia pastoris*

Afin de mieux comprendre l'implication des SNPs détectés sur le gène *vkorc1* dans le phénotype de résistance des souris aux AVKs, nous avons effectué une approche par mutagenèse dirigée dans le but de construire les plasmides pPicZ-B pour chaque mutation. Nous avons ensuite intégré ces différents plasmides dans la levure *Pichia pastoris* afin qu'elle produise les enzymes VKORC1 correspondantes. Les enzymes recombinantes ont été exprimées avec un tag C-myc permettant leur détection par Western Blot.

Ce modèle d'expression fut choisi car il a été développé au sein de notre équipe et sa fiabilité a été testée en le comparant à un modèle *in vivo* et *ex vivo*. En effet, dans son article paru en 2011, Hodroge montre une forte corrélation entre les résultats obtenus en utilisant des microsomes de foie de rat et ceux en utilisant des microsomes de levure, aussi bien pour la rVKORC1 WT que la rVKORC1 Y139F. De plus, lorsque les résultats de ces études sont confrontés à ceux d'une étude *in vivo* réalisée sur des rats porteurs de la mutation Y139F (176), les facteurs de résistance observés sont très fortement corrélés aux résultats obtenus par des approches enzymatiques *ex vivo* (microsomes de foies) ou *in vitro* (microsomes de levures recombinantes). Notre modèle d'expression hétérologue de VKORC1 via *Pichia pastoris* est un modèle fiable qui permet d'étudier les conséquences des différentes mutations retrouvées chez la souris sans avoir besoin de la souris directement. En effet, il est exclu de pouvoir piéger et développer une lignée de souris pour chaque mutation que nous avons découverte ou retrouvée en France. De plus, l'enzyme VKORC1 est une enzyme hépatique, afin d'avoir une quantité suffisante d'enzymes pour réaliser nos expériences, alors une quantité non négligeable d'animaux serait nécessaire. Afin de prendre en considération la volonté des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer), l'utilisation de notre modèle levure permet de remplacer l'utilisation des animaux par un système apportant des résultats équivalents et de diminuer le nombre d'animaux quand leur utilisation est indispensable. Le système *Pichia pastoris* permet d'obtenir en peu de temps une biomasse ainsi qu'un niveau d'expression suffisant afin de réaliser nos études enzymatiques.

Les activités enzymatiques que nous réalisons sont basées sur la mesure directe du produit de réaction de l'enzyme VKORC1 avec son substrat, l'époxyde de vitamine K (K1OX) : la vitamine K quinone. Afin de déclencher cette réaction enzymatique, le pouvoir réducteur est apporté dans la réaction par l'ajout de dithiothréitol (DTT). Cette méthode a été validé *in vivo*,

*ex vivo* et *in vitro* chez le rat brun (152,176,189). Les facteurs de résistance obtenus avec cette approche, en utilisant des microsomes de levure exprimant la VKORC1 WT de *Rattus norvegicus*, ont été corrélés avec succès avec les facteurs de résistance obtenus à partir de VKORC1 provenant de foie de rat brun WT. Une corrélation identique a été montrée dans le cas de la VKORC1 mutée Y139F.

A l'heure actuelle, d'autres modèles ont été développés afin d'étudier les conséquences des mutations sur l'enzyme VKORC1. Les modèles développés par le groupe de Stafford ou par le groupe d'Oldenbourg sont des modèles cellulaires dans lesquels le gène *vkorc1* a été « knock outé », mais aussi le gène *vkorcIII* dans le modèle de Stafford contrairement au modèle d'Oldenbourg. Dans ce modèle, un facteur de coagulation ou la partie « gamma-carboxylable » d'un facteur de coagulation a été surexprimé ainsi que le gène *vkorc1* ou ses mutants. Le paramètre mesuré pour évaluer l'activité de la VKORC1 est la concentration du facteur gamma-carboxylé (ou de sa fraction « gamma-carboxylable ») dans le milieu extracellulaire.

Dans ces deux modèles, l'étude des effets des mutations en terme de catalyse ( $V_{max}/K_m$ ) et en terme de résistance ( $K_i$ ) sont compliqués à interpréter. En effet, l'entrée du substrat n'est pas évidente : y-a-t-il un transporteur ? L'entrée de l'inhibiteur est également discutable, d'ailleurs les  $K_i$  dans ces modèles sont 100 fois inférieurs à ceux observés avec des systèmes microsomaux, reflétant ainsi que la concentration de l'inhibiteur en intra-cellulaire est sans doute bien plus importante qu'en extra-cellulaire. Mais la critique majeur que nous reprochons à ces deux systèmes est que l'activité enzymatique de la VKORC1 surexprimée est mesurée par la quantité de facteur surexprimé. Ainsi, il faut considérer que chaque enzyme produite dans la cellule recyclera des milliers molécules de vitamine K par minute et que chaque molécule de vitamine K recyclée permettra une gamma-carboxylation d'une protéine surexprimée.... Pour pouvoir assurer que le facteur limitant du paramètre mesuré sera l'activité de l'enzyme surexprimée, il faudrait que le substrat à gamma-carboxyler soit surexprimé des millions de fois plus que l'enzyme surexprimée. Autant dire que le paramètre limitant (entre une enzyme et un substrat) est clairement la production du substrat de gamma-carboxylation. On ne s'étonnera donc pas que tous les mutants qu'ils soient peu, moyennement actifs ou très actifs dans notre analyse de la catalyse, présentent une activité similaire à celle de la *vkorc1* wild type.

Nos études enzymatiques, elles, sont basées sur la quantification de la vitamine K quinone, ici de la réaction VKOR, donc directement liée à l'action de la VKORC1.

Le débat entre les différents protocoles d'étude de la VKORC1 n'est pas l'objectif de cette thèse. Cependant, notre choix du système d'expression en levure *Pichia pastoris* a été réalisé après mûre réflexion, car il semble être le modèle se rapprochant le mieux de la réalité. La fidélité de ce modèle nous a permis de mieux comprendre et de prédire les résistances liées aux mutations retrouvées sur la *vkorc1* de souris.

## **Premier mode de résistance de cible aux AVKs : les SNPs**

### a) Simple mutants

18 VKORC1 mutées ont été construites et étudiées. Ces mutations ont été soit décrites dans la littérature, notamment par Rost *et al* en 2009, soit découvertes au cours de notre étude Ratail. A la différence du rat brun où les SNPs sont localisés majoritairement sur l'exon 3 de *vkorc1* codant pour le site catalytique de l'enzyme, chez la souris, les SNPs sont retrouvés sur les 3 exons. Nous avons choisi de déterminer les constantes d'inhibition de VKORC1 WT et mutées vis-à-vis de 6 anticoagulants, des AVKs de première génération : le coumatétralyl, la chlorophacinone et la bromadiolone, et des AVKs de seconde génération : le difénacoum, le brodifacoum et la diféthialone. Le choix de ces AVKs a été basé sur le fait que ce sont les rodenticides les plus utilisés ou qui ont été les plus utilisés sur le marché. Pour chaque VKORC1 mutée et pour chacun des AVK utilisés, un facteur de résistance à ce produit a été établi correspondant au rapport des  $K_i$  VKORC1 mutée /  $K_i$  VKORC1 WT.

Sur l'ensemble des VKORC1 étudiées, deux mutations apportent une réelle résistance. Ces deux mutations sont L128S et Y139C. En effet, les AVKs de première génération sont inefficaces sur ces mutations. En ce qui concerne L128S, le  $K_i$  de la bromadiolone est multiplié par 13 et celui de la mutation Y139C est multiplié par 29. En revanche, ces mutations apportent une faible résistance aux AVKs de seconde génération. Ces AVKs restent donc efficaces. Pour les autres mutations, les facteurs de résistance aux premières générations sont relativement modérés, de l'ordre de 3 à 5. Pour les secondes générations, il n'y a pas de résistance.

b) Localisations des SNPs et conséquences fonctionnelles

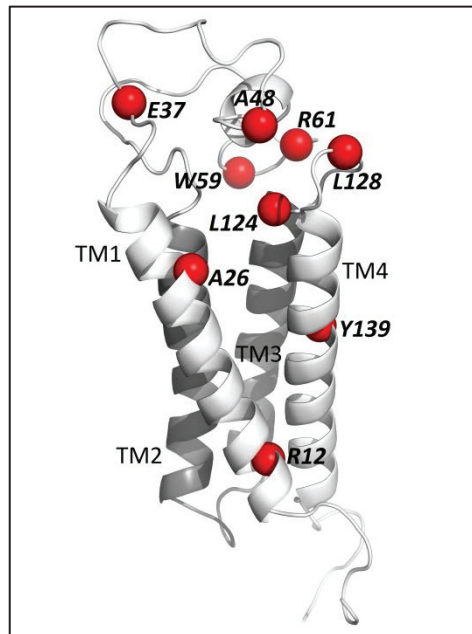


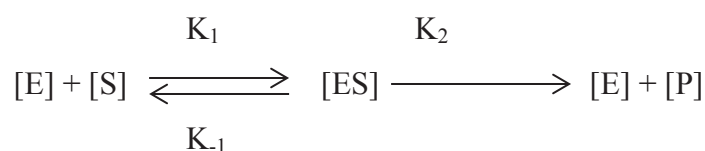
Figure 43 : Représentation de la structure de la protéine VKORC1 de souris avec localisation des différentes mutations rencontrées

Depuis la découverte de la structure cristalline de l'homologue bactérien de VKORC1, un modèle 3D de la protéine a été construit. A partir de ce modèle, de nombreuses études ont été entreprises afin d'observer comment les mutations peuvent affecter la structure de la protéine et son interaction avec son substrat et l'AVK. La position des mutations peut entraîner des modifications importantes de la conformation de la protéine, expliquant ainsi une diminution de sa sensibilité aux AVKs.

Les mutations en position R12 et A26 sont localisées sur le domaine transmembranaire 1 : TM1 (figure 43). Les mutations en position E37, A48, R58, W59 et R61 interviennent au niveau de la boucle luminaire entre le TM1 et le TM2. Les mutations L124 et L128 interviennent au niveau de la boucle entre le TM3 et le TM4. Enfin, Y139, elle, est située sur le TM4, au niveau du site catalytique de l'enzyme.

Stafford avait indiqué que le résidu 57 pouvait établir une liaison avec l'époxyde de vitamine K. Les mutations très proches de cet acide aminé (R58, W59) modifient très fortement la  $K_m$  de l'enzyme montrant que toute déformation de l'enzyme autour de cette zone modifie l'interaction avec le substrat. Il semble donc que la boucle luminaire et en particulier la demi-hélice alpha (acide-aminé 51 à 57) forme un « bouchon » mobile capable d'obturer le

canal formé par les quatre domaines transmembranaires. Un tel « bouchon » conserverait une certaine forme d'hydrophobicité dans le milieu réactionnel et stabiliserait l'interaction entre le substrat et l'enzyme. Ainsi, la constante de dissociation  $K_{-1}$  du complexe [enzyme-substrat] serait diminuée du fait de « l'étanchéité » de ce bouchon. Toute déformation de ce « bouchon » se traduirait par une augmentation de  $K_{-1}$  et donc par une augmentation du  $K_M$ .



$$K_M = (K_{-1} + K_2) / K_1$$

Les mutations L128S et Y139C sont localisées à proximité (L128S) ou sur le 4<sup>ème</sup> domaine transmembranaire de VKORC1 (Y139C). Ces deux positions de mutation sont courantes, non seulement chez la souris mais également chez le rat brun. La mutation L128S conduit à une résistance non négligeable aux premières générations. Cette mutation est localisée juste avant le site catalytique : CXXC de l'enzyme, dans une région riche en résidus aromatiques : FFVLYDF. Cette séquence a été décrite par Stafford comme formant une poche hydrophobe qui interagit avec le cycle aromatique de la vitamine K ou celui des AVKs. Ainsi une substitution d'un acide aminé en position 128 ou 139 peut perturber la bonne liaison du substrat ou de l'AVK avec VKORC1 et ainsi diminuer la sensibilité de VKORC1 aux AVKs. Le remplacement d'un acide aminé par un autre plus polaire, dans la poche, peut considérablement modifier le site de liaison avec un AVK hydrophobe. Or, la leucine et la phénylalanine sont des acides aminés apolaires. En revanche, la sérine et la tyrosine sont toutes les deux des acides aminés polaires. Ceci peut potentiellement expliquer la diminution de la sensibilité de VKORC1 aux AVKs. De plus, Lasseur *et al* (190), ont montré que la longueur de la chaîne latérale des AVKs est corrélée avec la diminution des  $K_i$  de la VKORC1. En effet, de la warfarine à la diféthialone, il y a progressivement une augmentation de la longueur de cette chaîne. Plus la chaîne est de taille importante, plus l'hydrophobicité des AVKs augmente. De ce fait, les AVKs sont plus stables dans leur interaction avec VKORC1. Ainsi, la position L128 et Y139 va interagir avec le noyau indane-1,3-dione ou 4-hydroxycoumarine ou thiocoumarine des AVKs mais pas avec la chaîne latérale.



Les acides aminés modifiés sont positionnés sur les secteurs transmembranaires, entre ces secteurs ou sont juxtaposés à un éventuel site de fixation du substrat ou de l'inhibiteur. Ainsi, ces mutations vont modifier faiblement ou très fortement la sensibilité de l'enzyme à son inhibiteur. Prévoir les effets de ces mutations sur la protéine en travaillant sur les modifications de sa structure est cependant assez compliqué.

### c) Doubles mutants

La souris domestique, en France, possède une large palette de mutations présentes sur les 3 exons de *vkorc1*. Une telle variété de mutations n'est retrouvée que chez la souris. Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène est qu'en France, durant plusieurs dizaines d'années, la molécule utilisée essentiellement pour gérer les populations de souris était la chlorophacinone, un AVK de première génération. Cette molécule est efficace contre des souris WT. En revanche, cette molécule a sélectionné un grand nombre de mutations qui n'apportent pas une résistance fondamentalement élevée. Cependant, les souris sont naturellement moins sensibles aux AVKs de par leur comportement alimentaire. En effet, elles se nourrissent de plusieurs sources alimentaires différentes en faibles proportions. La prise alimentaire d'un appât étant restreinte, elles consomment moins d'appâts qu'un rat brun. De plus, grâce au facteur de résistance apporté par ces mutations, certes plus faible que celui procuré par la mutation L128S ou Y139C, cela permet aux souris de résister à la chlorophacinone. En revanche, dans le cas du rat brun, les rodenticides utilisés ont été plus puissants que de la chlorophacinone, tel que de la bromadiolone ou du difénacoum par exemple. Ainsi, leur utilisation contre le rat brun a sélectionné un nombre peu important de mutations pouvant y résister (L120Q, Y139C, Y139F). Ces mutations sont très résistantes aux premières générations et seulement positionnées sur l'exon 3 du gène *vkorc1* de rat brun.

Chez la souris, les mutations sont présentes sur les 3 exons. Ainsi, lorsque deux souris possédant des mutations différentes se reproduisent, des recombinaisons peuvent se produire de sorte à former des descendants présentant des doubles mutations (figure 44).



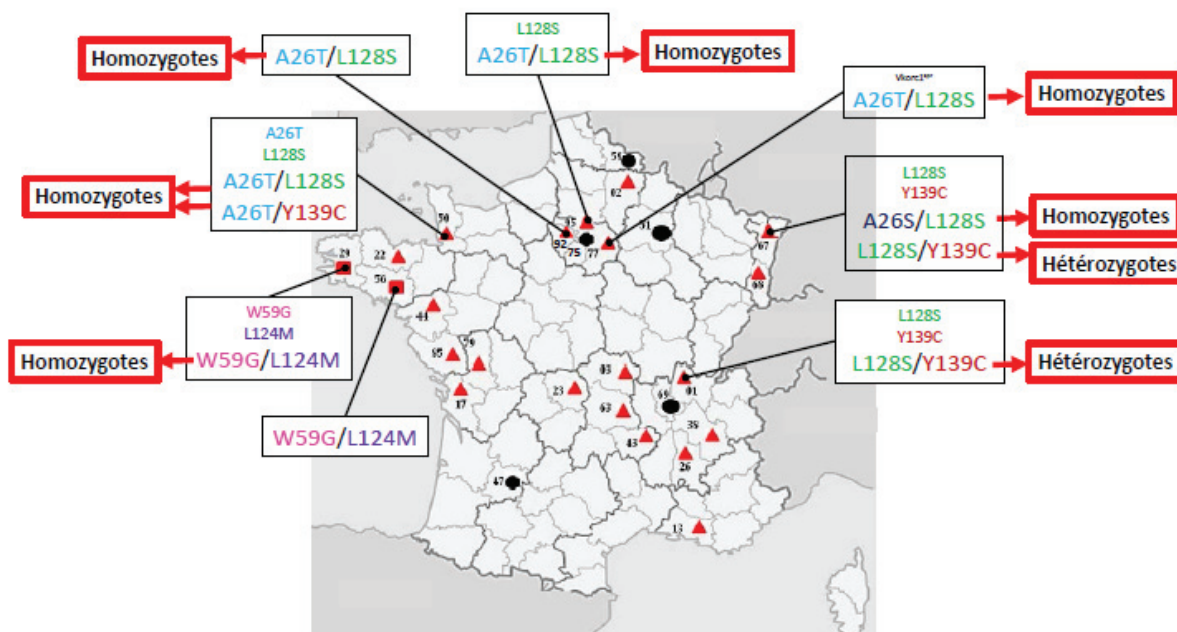


Figure 44 : Localisation de souris possédant des doubles mutations en France

En France, sur des sites où se retrouvent les mutations A26T et L128S, nous avons trouvé des souris doubles mutées 26T/128S à l'état homozygote. Le même phénomène a été retrouvé avec les mutations A26S et L128S avec des souris doubles mutées 26S/128S à l'état homozygote, les mutations W59G et L124M avec des souris homozygotes 59G/124M et également avec les mutations L128S et Y139C avec des souris 128S/139C à l'état hétérozygote seulement. Jusqu'à maintenant, ce phénomène n'avait jamais été observé. Cependant, dans le cas de la souris domestique, des mutations différentes sont présentes sur un même site. Cela est une spécificité de la souris. En effet, ceci n'est pas retrouvé chez le rat brun, car chez cette espèce, une seule mutation est retrouvée dans un secteur global, avec une proportion de rats porteurs de mutation et de rats WT qui varie. Et de par le comportement moins agressif des souris, nous pouvons supposer que des interactions ont lieu entre deux colonies différentes de souris. En se reproduisant, des recombinaisons sont possibles, notamment entre l'exon 1 et l'exon 3 du gène *vkorc1*.

Toutes les enzymes VKORC1 présentant des doubles mutations ont été étudiées *in vitro* afin de caractériser leur sensibilité vis-à-vis des AVKs de première et de seconde génération. Les résultats de cette étude montrent un cumul de la résistance apportée par chacune des mutations. Bien que les mutations L128S et Y139C apportent une résistance significative aux AVKs de première génération, les facteurs de résistance envers les secondes générations sont faibles, ne permettant pas à ces souris de survivre en cas d'utilisation de brodifacoum ou de

diféthialone. En revanche, avec deux mutations sur VKORC1, que ce soit 26S/128S, 26T/128S ou 26T/139C, les facteurs de résistance au brodifacoum et à la diféthialone sont de l'ordre de 10. Ainsi, les souris doubles mutées homozygotes sont résistantes aux secondes générations. D'ailleurs, ces souris ont été retrouvées sur des sites où l'emploi de plusieurs AVKs différents avait échoué, que ce soit des AVKs de premières ou de secondes générations (tels que la bromadiolone et le difénacoum).

Les rats bruns, eux ne présentent pas, à ce jour, de doubles mutations, et il y a peu de probabilités qu'ils se retrouvent un jour dans cette situation. En effet, les mutations chez cette espèce sont essentiellement localisées sur l'exon 3 de *vkorc1*. De par leur comportement social, il y a peu de chances que deux rats bruns venant de deux colonies différentes, avec deux mutations différentes, se reproduisent. Par ailleurs, même si cela avait lieu, des recombinaisons au niveau d'un même exon sont aussi très rares.

Une problématique se pose concernant la gestion des souris domestiques dans les pays du nord de l'Europe. Dans ces pays, notamment au Danemark, les autorités exigent une utilisation des AVKs graduelle, en commençant par les premières générations : coumatétralyl, puis chlorophacinone puis bromadiolone et ensuite en cas d'échec, l'utilisation d'AVKs de seconde génération est autorisée. Cette stratégie a pour but de limiter l'apparition de résistances aux secondes générations en diminuant leur emploi. De plus, cette stratégie permet de limiter les risques d'écotoxicité secondaire. Cependant, de par notre expérience maintenant, nous pouvons prédire que cette stratégie risque au contraire de sélectionner des mutations sur les 3 exons de la *vkorc1* de leurs souris domestiques, puis de favoriser l'apparition de doubles mutants. Ce faisant, ils vont, par eux-mêmes, provoquer l'apparition de résistance aux AVKs de seconde génération.

#### d) SNP découvert chez le *Rattus rattus*

Jusqu'à maintenant, peu d'informations sont connues concernant la résistance possible des rats noirs aux AVKs. Cette espèce étant moins au contact direct et à la vue de l'homme, contrairement au rat brun, elle a été beaucoup moins traitée aux AVKs. En 2001, Sugano *et al* ont décrit, chez *Rattus rattus*, un cas de résistance métabolique au Japon (178). Cette résistance provenait d'une surexpression du cytochrome CYP3A responsable du métabolisme des AVKs.

Récemment, grâce au projet Ratail, des échantillons de rats noirs nous ont été envoyés. Ces échantillons provenaient d'une ferme à Saragosse, en Espagne, où de nombreuses campagnes

de traitement à la Bromadiolone avaient été réalisées, mais engendraient un faible taux de mortalité chez ces animaux. A partir des échantillons, une fois l'ADNg extrait et le gène *vkorc1* séquencé, un SNP fut découvert sur l'exon 1 du gène. Ce SNP engendrait la mutation Y25F sur VKORC1. Cette mutation n'avait jamais été caractérisée auparavant. Après analyse *in vitro* des propriétés catalytiques de cette enzyme VKORC1 mutée Y25F, nous avons montré que cette mutation conduit à une augmentation des constantes d'inhibition des AVKs. L'hypothèse avancée est que la mutation Y25F cause une perte partielle de la structure hélicoïdale de la TM4 de VKORC1. La modification de la structure de l'enzyme provoquerait une diminution de sa sensibilité aux AVKs, notamment à la Bromadiolone. Actuellement, des recherches sont entreprises sur la résistance de cible chez l'espèce *Rattus rattus*.

### **Second mode de résistance de cible : l'introgession du gène *vkorc1 spretus***

Lors de l'étude Ratail, nous avons reçu des échantillons de souris dont la séquence *vkorc1* était légèrement différente de la séquence *vkorc1* des *Mus musculus domesticus*. Cette séquence particulière était la *vkorc1* de *Mus spretus*. Cependant, la séquence du cytochrome b de ces souris présentait plus de 99% d'homologie avec la séquence de *Mus musculus domesticus*. Comme l'a démontré Kohn et son équipe, il y a eu introgression du gène *vkorc1 spretus* dans le génome de *Mus musculus domesticus*, du fait d'un croisement entre ces deux espèces. Ce croisement, donnant lieu à des hybrides, avait déjà été décrit précédemment par Song et Pelz. Rost *et al* ont décrit la découverte de ce groupe pour la première fois en Allemagne. Ces hybrides ont été par la suite décrits en Suisse et en Espagne. En Espagne, 93% des souris domestiques sont des souris introgressées *spretus*. L'Espagne a été le pays présumé où le croisement initial entre la *Mus spretus* et la *Mus musculus domesticus* a débuté dû à la coexistence des deux espèces dans ce pays. En Angleterre, en Italie et en Grèce, aucune souris introgressée *spretus* n'a été retrouvée pour le moment. Dans le sud de la France, une coexistence des deux espèces avait été décrite. Cependant, avec le projet Ratail, nous avons identifié des souris introgressées *spretus* à Lyon, mais également à Paris et dans le nord de la France. Ainsi, ces hybrides sont largement disséminés en France. L'introgession du gène *vkorc1 spretus* proviendrait de l'introgession naturelle de 10Mb du chromosome 7 des *Mus spretus* dans nos souris domestiques. La VKORC1 *spretus* diffère de la VKORC1 *domesticus* par la substitution de 4 acides aminés : R12, A26, A48 et R61 sont remplacés par 12W, 26S, 48T et 61L.

#### a) Capture de souris introgressées *spretus* et étude in vivo de la résistance

À Lyon, des souris introgressées *spretus* ont été retrouvées à l'état homozygote dans une boulangerie et ont été capturées. Nous avons ainsi pu créer une lignée de souris introgressées *spretus* dans nos animaleries afin de confirmer et de caractériser la résistance de ces souris aux AVKs de première et de seconde génération. Nous avons, dans un premier temps, réalisé des tests in vivo en aquarium en remplaçant l'alimentation de ces souris introgressées *spretus* par des AVKs pendant 5 jours, pour les mâles et les femelles en parallèle. Le coumatétralyl 375 ppm, la chlorophacinone 50 ppm, la bromadiolone 50 ppm, le difenacoum 50 ppm, la diféthialone 25 ppm, le brodifacoum 50 ppm et le flocoumafène 50 ppm ont été testés. Ensuite, un suivi de la mortalité de ces souris a été effectué durant 21 jours. Ce test nous a démontré l'inefficacité des premières générations sur ces souris. Song avait trouvé des résultats identiques dans son étude (7). Les AVKs de seconde génération eux restent assez efficaces pour gérer les populations de souris introgressées *spretus*. Enfin, nous avons observé une nette différence de sensibilité aux AVKs entre les mâles et les femelles. Il semblerait que les femelles soient moins sensibles à l'action des AVKs que les mâles.

#### b) Etude de la VKOR hépatique des souris *spretus*

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de cette résistance, nous avons décidé de comparer le phénotype observé de ces souris introgressées *spretus* avec les propriétés de l'activité de VKOR de microsomes hépatiques. En effet, Pelz *et al* (177) dans leur publication avaient soulevé l'intérêt d'étudier l'activité VKOR de ces souris. Cependant, ne disposant pas de microsomes hépatiques de ces souris, ils n'avaient pas été en mesure de réaliser cette expérience. Cette expérience nous a montré une augmentation considérable des  $K_i$  pour les AVKs de première génération, que ce soit pour les mâles ou les femelles. Les  $K_i$  des molécules de première génération obtenus dans cette étude pour les microsomes de foie de souris introgressées *spretus* sont de 10 à 100 fois plus élevés que ceux obtenus à partir de microsomes de foie de souris WT. La différence de sensibilité aux AVKs entre les mâles et les femelles a été également retrouvée lors de cette expérience.

Tableau 7 : Comparaison entre les facteurs de résistance *in vitro* et la mortalité observée *in vivo* chez des souris introgressées *spretus* mâles et femelles pour des AVKs de première et seconde génération

	Souris introgressées <i>spretus</i> mâles		Souris introgressées <i>spretus</i> femelles	
	Facteur de résistance <i>ex vivo</i>	% de mortalité observé <i>in vivo</i>	Facteur de résistance <i>ex vivo</i>	% de mortalité observé <i>in vivo</i>
Warfarine	45	ND	118	ND
Coumatetralyl	19	20	25	0
Chlorophacinone	14	50	13	0
Bromadiolone	7	60	14	0
Difenacoum	5	100	3	80
Difethialone	3	100	1	100
Brodifacoum	3	100	1	100
Flocoumaféne	4	100	1	100

Nous avons montré une corrélation directe entre le facteur de résistance observée *in vitro* et la mortalité observée lors de nos tests en aquarium (tableau 7). Pour un facteur inférieur à 5, il n'y a pas de résistance. Cela s'observe pour les AVKs de seconde génération. Lorsque le facteur de résistance est compris entre 5 et 10, une résistance modérée apparaît, c'est le cas notamment pour la Bromadiolone. Enfin, pour des facteurs de résistance supérieurs à 10, une sévère résistance est en place, et cela s'observe par une faible mortalité des souris pour les AVKs de première génération.

Afin de démontrer l'implication de l'ensemble des quatre mutations VKORC1 dans les propriétés de l'activité de VKOR mesurée dans le foie de souris introgressées *spretus*, nous avons produit des levures exprimant soit la VKORC1 *spretus*, soit la VKORC1 WT et déterminé les facteurs de résistance induits par les quatre mutations de VKORC1. Ce facteur de résistance correspond au rapport de la Ki obtenu pour les microsomes de levure exprimant la VKORC1 *spretus* avec le Ki obtenu pour les microsomes de levure exprimant la VKORC1 WT. Il est clair que les quatre mutations modifient la résistance aux AVK de l'enzyme VKORC1 et ces modifications sont similaires aux modifications obtenues pour des microsomes hépatiques. L'utilisation des enzymes recombinantes VKORC1 permet de donner des informations directes sur les propriétés catalytiques de l'activité de VKOR du foie qui est clairement en lien avec le phénotype de résistance *in vivo*.

c) Autres voies possibles de résistance chez les souris introgressées *spretus*

Nos expériences ont montré que la VKORC1 *spretus* est responsable du phénotype de résistance des souris introgressées *spretus* aux AVKs. Cependant, à cette résistance pourrait être ajoutée une résistance métabolique. En effet, la présence de nombreux fragments du génome de *Mus spretus* introgressés dans le génome de *Mus musculus domesticus* pourrait être associée à des mécanismes de résistance supplémentaires. L'expression accrue de caluménine a été décrite chez les rats comme prenant partie dans le phénotype de résistance aux AVKs (191).

Cependant, chez nos souris, aucune différence dans l'expression de la caluménine dans le foie n'a été observée par PCR en temps réel entre les génotypes.

Une expression altérée de un ou plusieurs cytochromes a déjà été proposée pour servir de médiateur ou pour directement être impliquée dans la résistance aux AVKs (178,179,192). Cependant, les concentrations des AVKs de seconde génération dans le foie entre les souris introgressées *spretus* et les souris domestiques sont similaires. Cela ne suggère ainsi aucune différence d'expression des gènes de cytochromes entre les deux génotypes.

Toutes ces observations prises ensemble sont donc en faveur de l'implication exclusive du génotype VKORC1 *spretus* dans le phénotype de résistance *in vivo* observé.

d) Mutations contributives de la résistance du génotype *spretus*

L'introgession du gène *vkorc1* *spretus* est donc un mécanisme efficace de résistance aux AVKs. Il est intéressant de noter que Song *et al* en 2011 ont montré que le groupe *spretus* de 4 mutations (12, 26, 48 61) pouvait perdre une de ses mutations à l'extrémité 5' ou 3' de l'ensemble (12, 26, 48 ou bien 26, 48 et 61) et donc être retrouvé sous la forme de triples mutants voire même de doubles mutants (26S, 48T ou 48T, 61L ou 26S, 61L) et même de simples mutants (A26S) (7).

L'existence de ces doubles mutants A26S, A48T ou de simple mutant A26S nécessite soit une double recombinaison méiotique dans une zone remarquablement étroite de façon à exciser les mutations en 12 et les mutations R61L tout en conservant une ou deux mutations internes soit un processus plus vraisemblable et d'ailleurs plus fréquent de non cross over (NCO). Un tel phénomène est également indispensable pour expliquer le double mutant 26L, 61L qui sinon impliquerait 3 recombinaisons pour exciser la mutation en 12W et la mutation en 48T. Notons que si le NCO se produit chez une souris hétérozygote porteuse d'un allèle de type *spretus* et un second allèle de type 128S, alors la double mutation A26S/L128S est expliquée.



Il apparaît donc clairement que toutes les combinaisons de mutations issues du groupe *spretus* sont possibles et seront vraisemblablement retrouvées. En conséquence réaliser l'étude des conséquences catalytiques de chacune de ces combinaisons et en particulier en terme de résistance est utile en terme de gestion des populations. Il faut rajouter qu'en terme de compréhension du mécanisme de la VKORC1 une telle étude est passionnante pour l'évaluation du rôle de chacune de ces mutations et dans la mise en évidence de synergie entre ces différentes mutations

Grâce à notre système d'expression en levure, nous avons construit chaque mutant du groupe *spretus* puis les doubles et triples mutants pour chaque combinaison possible et chacune des VKORC1 a été exprimée en levure. Pour toutes les mutations à l'état seul, la résistance est relativement faible, aucune d'elles n'est donc responsable du degré de la résistance apporté par le groupe des 4 mutations. En ce qui concerne les doubles mutants, nous observons une résistance moyenne aux premières générations. Il y a un phénomène de cumul de la résistance apportée par chaque mutation. En revanche, dans le cas des triples mutations, nous trouvons des résistances très sévères aux AVKs de première génération. Il semblerait ainsi que ce soit l'association de plusieurs de ces mutations qui soit causale de la résistance, et non pas une mutation majoritaire.

Dans son étude, Pelz *et al* suggèrent que la mutation 61L est moins liée que les autres mutations (177). En Allemagne, Pelz et son équipe ont trouvé de nombreuses souris introgressées *spretus* avec le génotype 12W/26W/48T, donc dépourvu de la mutation 61L. Dans notre étude, l'analyse du triple mutant 12W/26S/48T a montré une résistance du même ordre que celle apportée par le groupe *spretus* entier. Cela semble suggérer que la mutation 61L n'apporte pas une contribution indispensable à la résistance. L'étude du triple mutant 26S/48T/61L apporte un degré de résistance du même ordre que le groupe *spretus* et du triple mutant 12W/26S/48T. La mutation 61L ne paraissant pas contributive de la résistance, il semblerait que le motif 26S/48T ajouté à une autre mutation soit responsable de la résistance. Cela se vérifie d'ailleurs pour les autres triples mutants, à savoir 12W/26S/61L et 12W/48T/61L dont les degrés de résistance sont bien plus faibles.

Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que le motif 26S/48T est indispensable à l'enzyme VKORC1 *spretus* afin de résister aux AVKs.

Le développement intensif de l'agriculture, l'ouverture des frontières en Europe facilitant le transport des marchandises ainsi que d'autres facteurs ont permis la dispersion des souris domestiques ainsi que la rencontre et la reproduction entre *Mus musculus domesticus* et *Mus spretus*. Le traitement toujours plus important avec des AVKs de première génération a favorisé l'hybridation de ces deux espèces afin de former des souris *Mus musculus domesticus* possédant une VKORC1 *spretus* très résistante aux AVKs de première génération. Donc ce mécanisme d'introgession du gène *vkorc1 spretus* est une adaptation des souris pour résister aux AVKs, d'où le terme employé par Song : « Adaptative introgression hybridation », avec un transfert horizontal de la résistance de *Mus spretus* vers *Mus musculus domesticus*. Avec la pression de sélection maintenue, les souris introgressées *spretus* voient leur fitness temporairement augmenté. Leur résistance leur permet de survivre plus longtemps, donc ces souris possèdent plus de chances de pouvoir se reproduire et de transmettre leur gène *vkorc1 spretus*. Cela explique ainsi la large diffusion de ces souris introgressées *spretus* en Europe.

### **Troisième mode de résistance de cible : gène de suppléance à *vkorc1***

#### a) Gène de suppléance à *vkorc1*

Des mutations provoquant une diminution importante de l'activité de VKORC1 voire l'inactivité de la protéine sont décrites chez le rat brun ainsi que chez l'homme. En effet, à l'état homozygote, chez l'homme, le porteur de ce genre de mutation est alors atteint du syndrome VKCFD2. Cependant, grâce à un traitement adapté de vitamine K administré par voies orales ou intraveineuses, les patients peuvent survivre. Les souris possédant une mutation inactivante à l'état homozygote, elles, ne devraient pas pouvoir survivre. Cependant, nous avons capturé des souris homozygotes 59G et nous avons créé une lignée de ces souris dans notre animalerie. Ces souris homozygotes mutées 59G, qui ont une enzyme VKORC1 inactive, survivent tout de même très bien et ne présentent pas de trouble de la reproduction. Par ailleurs, l'étude de la distribution transcriptionnelle des enzymes du cycle de la vitamine K a montré que l'expression des ARNm de *vkorc1* est quasi nulle. Ces résultats excluent ainsi la participation de la VKORC1 à l'activité VKOR. Pourtant, l'activité VKOR est belle et bien présente dans les microsomes de foie de ces souris 59G. En conséquence, une autre enzyme catalyse l'activité VKOR chez ces souris.

Un test en aquarium, à la warfarine, a été réalisé sur ces souris, pour les mâles et les femelles. Alors que les souris non mutées ont un taux de mortalité de 100%, les homozygotes mutées 59G mâles et femelles ont respectivement un taux de mortalité de 5% et 15%. Afin d'aller



plus loin dans la compréhension de la résistance de ces souris 59G, nous avons comparé leur phénotype de résistance avec les propriétés de l'activité VKOR de microsomes hépatiques. Les  $K_i$  obtenus pour les molécules de première génération, à partir de microsomes de foie de souris 59G, sont entre 10 et 60 fois plus élevés que ceux obtenus à partir de microsomes de foie de souris WT. Concernant les AVKs de seconde génération, il n'y a pas de différence de  $K_i$ .

L'enzyme catalysant l'activité VKOR chez les souris 59G est donc naturellement moins sensible à l'action des AVKs de première génération. Lors de cette étude, nous avons testé, chez ces souris, l'expression du gène *vkorcIII*. L'enzyme VKORC1L1 est normalement peu exprimée dans le foie, par ailleurs, elle est connue pour être capable de catalyser l'activité VKOR et aussi pour être naturellement moins sensible que VKORC1 aux AVKs. Cependant, l'expression des ARNm *vkorcIII* chez les souris homozygotes 59G est identique à celle des souris WT. L'enzyme VKORC1L1 n'est donc pas l'enzyme permettant de catalyser l'activité VKOR chez les souris 59G. Il apparaît donc que *vkorcI* est suppléé par un autre gène chez les souris 59G, et ce gène code pour une enzyme naturellement moins sensible aux AVKs de première génération.

#### b) Découverte de la mutation W59G

Lors de notre étude Ratail, nous avons répertorié des souris portant une mutation en position 59 sur VKORC1 : la mutation W59G. Ces souris ont été trouvées majoritairement dans le Finistère. Rost, dans son étude, avait découvert la mutation W59R présente chez le rat brun et il l'avait caractérisée comme étant une VKORC1 très peu active. Nous avons exprimé la VKORC1 mutée 59G grâce à notre système levure afin d'étudier les propriétés catalytiques de cette enzyme. Cependant, cette VKORC1 est inactive. La mutation 59G rend non fonctionnelle l'enzyme VKORC1. Or, dans la littérature, d'autres mutations en position 59 sont décrites sur la VKORC1 de souris : la mutation W59L et la mutation W59S. Nous avons exprimé ces deux VKORC1 avec la levure *Pichia pastoris* et nous avons constaté le même résultat : ces deux VKORC1 mutées sont également inactives. Il semblerait ainsi qu'un changement d'acide aminé en position 59 de l'enzyme VKORC1 entraîne une modification de sa structure qui la rend non fonctionnelle.

c) Localisation du gène de suppléance dans le génome de *Mus musculus domesticus*

De façon à localiser plus précisément la position de ce gène dans le génome des souris 59G, nous avons introgressé cette mutation sur 7 générations dans le fond génétique de souris CD1. Par analogie avec une étude similaire réalisée chez le rat par Grandemange *et al* en 2009, nous pouvons considérer qu'il ne subsiste que 0.4% du génome sauvage des souris 59G et un fragment de 10 à 30 MB entourant *vkorc1* issu des souris 59G sur le chromosome 7. La lignée de souris formée possède ainsi plus de 99% du génome des souris CD1. Après 7 générations, les souris homozygotes 59G survivent et sont résistantes à la warfarine. Ainsi, nous pouvons en conclure que le gène qui code pour l'activité VKOR, chez les souris 59G, est localisé très près du gène *vkorc1*, donc il est présent sur le chromosome 7 de ces souris.

L'utilisation intensive des AVKs a sélectionné de nombreuses mutations permettant aux souris de survivre. Cependant, certaines des mutations sélectionnées ne rendent pas la VKORC1 moins sensible aux AVKs mais inactivent cette VKORC1. A cause de cette VKORC1 mutée non fonctionnelle, les souris mutées en position 59 ont su s'adapter. Le gène *vkorc1* conduisant à une enzyme non fonctionnelle, les ARNm *vkorc1* ne sont plus produits ou en très faible quantité, et un autre gène a remplacé le rôle de *vkorc1* en codant pour une enzyme catalysant l'activité VKOR. De plus, cette enzyme étant moins sensible aux AVKs, elle apporte un avantage en terme de survie tant que la pression de sélection est maintenue. Cela permet ainsi une dissémination de ces souris 59G et une transmission de ce gène inconnu.

## Partie 8 : Conclusions

---

La résistance aux AVKs est un problème tant en médecine humaine qu'un problème dans la gestion des populations de rongeurs sauvages. La résistance de cible, impliquant des mutations dans le gène de la vitamine K époxyde réductase (*vkorc1*), est retrouvée à la fois chez l'homme et chez les rongeurs. Néanmoins, en raison de l'utilisation massive de ces molécules en tant que rodenticides depuis près de 50 ans, l'importance de ce phénomène est extrême chez les rongeurs sauvages.

Une enquête de terrain nous a permis de mettre en évidence de nombreuses mutations sur le gène *vkorc1* tant chez le rat noir que chez la souris. La mutation retrouvée chez le rat noir (Y25F) était présente dans des élevages dans lesquels la prolifération de ces rongeurs n'était plus contrôlable malgré l'utilisation de bromadiolone. La caractérisation des propriétés de l'enzyme recombinantes confirme en effet que la mutation Y25F induit une forte résistance à cette molécule.

De nombreuses mutations ont été retrouvées voire même découvertes chez des souris sauvages en France. À nouveau, la caractérisation des protéines recombinantes exprimant 18 de ces mutations a été réalisée.

Sur les 18 VKORC1 mutées caractérisées, deux mutations simples, L128S et Y139C, impliquent une résistance sévère aux AVKs de première génération et une résistance faible aux AVKs de seconde génération. Cependant, chez ces souris, nous avons montré que des recombinaisons sont possibles et sont retrouvées en France. Ces recombinaisons engendrent des doubles mutations sur le gène *vkorc1* et sur l'enzyme VKORC1. Ces doubles mutations ont pour conséquence une résistance sévère aussi bien pour les AVKs de première que de seconde génération.

De plus, nous avons confirmé la présence de souris introgressées *spretus* en France. Ces souris sont maintenant largement disséminées, puisqu'elles se retrouvent aussi bien dans le sud que dans le nord de la France. Nous avons démontré dans un premier temps que ces souris sont totalement résistantes aux AVKs de première génération, l'utilisation de seconde génération est l'unique possibilité pour contrôler ces populations de souris. Dans un second temps, nous avons fourni la preuve que le phénotype de résistance n'est pas dû à une résistance métabolique mais exclusivement à la VKORC1 *spretus* avec ses quatre mutations 12W, 26S, 48T et 61L. Nous avons également retrouvé des souris porteuses non pas des

quatre mutations caractéristiques de *vkorc1 spretus*, mais porteuses de 3 ou 2 voire une seule de ces mutations. La caractérisation des protéines mutées correspondantes a été réalisée et a montré que la résistance est due à une synergie entre à minima 2 mutations et au mieux 3 de ces mutations. Nous avons montré que bien évidemment, les mutations retrouvées mais surtout les associations de mutations retrouvées étaient bien celles qui induisaient une résistance maximale et qui ont été sélectionnées par l'évolution de cette espèce dans un milieu sous pression de sélection par les AVKs.

Une dernière mutation (W59G) a retenu notre attention dans la mesure où elle inactive la protéine mutée recombinante correspondante. De telles mutations inactivantes ayant été retrouvées chez l'homme à l'état hétérozygote, nous voulions connaître les conséquences de l'état homozygote sur la survie de ces animaux. Des souris W59G ont été piégées, séquencées et maintenues en élevage. Nous avons ainsi obtenu des animaux homozygotes (W59G) qui se sont révélés parfaitement viables alors même que non seulement l'activité de l'enzyme recombinante est indétectable mais également les ARNm correspondant sont indétectables. L'activité VKOR hépatique est, de façon surprenante, quantitativement normale mais résistante à la warfarine. L'introgession de cette mutation dans un fond génétique de souris de laboratoire, sur plus de 7 générations ne nous a pas permis de séparer le phénomène de résistance et le génotype qui apparaissent très liés génétiquement l'un à l'autre.

Les études menées dans ce travail permettent de mieux comprendre l'évolution des rongeurs dans un environnement où une pression de sélection par les AVKs est intense. Mais aussi d'un point de vue très pratique, *les caractérisations in vivo et in vitro effectuées des différentes VKORC1 au cours de cette thèse permettront à l'avenir de cibler les molécules appropriées lorsque le génotype spécifique est détecté afin de gérer les populations de rongeurs. La recherche fondamentale permet ainsi de répondre à des questions concrètes afin d'identifier des méthodes efficaces et pérennes permettant une meilleure gestion intégrée des rongeurs.*

## *Partie 9 : Perspectives*

---

Cette étude montre de façon très claire qu'il existe, en France, une résistance aux AVK au sein des populations de rats noirs et de souris domestiques. Cette résistance est très fréquente au point qu'il est difficile de piéger des animaux sensibles.

Dans cette mesure, il nous apparaît indispensable de se poser la question de savoir pourquoi ne mettons-nous pas en place d'autres méthodes de lutte ?

La réponse à cette question est complexe. Peut-on se passer de lutte chimique ? Une approche sanitaire de la lutte est évidemment primordiale. Ceci est particulièrement vrai pour les plus commensaux des rongeurs, les souris et le rat brun. La lutte physique par les pièges et tapettes diverses est importante mais reste difficile et modérément efficace. La lutte biologique et la gestion écologique est possible voire très importante pour les rongeurs agricoles (rats noirs, campagnols...) mais l'utilisation des prédateurs est peu efficace contre les souris et les rats bruns. Ainsi, la lutte chimique semble nécessaire, mais pourquoi se focaliser sur les AVK ?

Tout d'abord, les AVK sont des toxiques mais ils possèdent un antidote, la vitamine K, qui permet en moins d'une heure de restaurer la coagulation chez un humain ou chez un animal domestique intoxiqué. Ces molécules ne sont ni cancérigènes ni mutagènes et la reprotoxicité qui risque de leur être reprochée est liée à des conditions d'utilisation qui ne peuvent être rencontrées dans le cadre de l'usage ou même des « mésusages » de ces produits. Enfin, pour des raisons d'éviction alimentaire, ces molécules à effet retardé, sont particulièrement efficaces chez les rongeurs. De ce point de vue, ces molécules restent sans concurrence.

Considérant qu'il n'existe pas d'alternative actuellement crédible aux AVK, il semble déraisonnable d'arrêter l'utilisation de ces molécules. Il est donc indispensable pour la suite, de continuer à travailler sur la résistance à ces AVK, de cartographier ces résistances, de surveiller leurs développements et leurs évolutions, d'évaluer leurs coûts biologiques et d'utiliser ces coûts biologiques pour faire régresser ce phénomène.

Ainsi, la surveillance et l'évolution des résistances est un point très important. Chez le rat brun, 3 mutations (L120Q, Y139F et Y139C) sont dominantes voire exclusives. Une recombinaison entre les codons 120 et 139 est imaginable mais elle est très peu probable car d'une part, ces codons sont extrêmement proches mais aussi d'autre part parce que les populations porteuses de ces mutations sont fondamentalement séparées géographiquement.

Chez la souris la situation apparaît plus complexe et sans doute moins aboutie. De nombreux SNPs ont été découverts et leurs conséquences sur VKORC1 ont bien été caractérisées. Cependant, nous sommes face à un ensemble de mutations qui se recombinent encore et qui évoluent de façon très dynamique. Il est donc très important de surveiller cette évolution. De plus, il subsiste plusieurs régions en France dont nous n'avons pas reçu d'échantillon. En effet, le sud-est et l'ouest de la France sont bien représentés, mais ce n'est pas le cas du sud-ouest. La découverte des doubles mutants étant très récente, l'existence d'autres VKORC1 doubles mutés est très probable et leurs caractérisations permettraient de compléter notre étude.

Par conséquent, le suivi des mutations et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués, en particulier les modifications des règles de relations structure activité induites par chacune de ces mutations, pourraient permettre de mettre en place de nouveaux AVK spécifiquement conçus pour lutter contre certaines résistances importantes et si possible particulièrement efficaces chez les rongeurs résistants et non les sensibles. De telles molécules permettraient de diminuer la proportion d'individus résistants.

L'évaluation du coût biologique de la résistance est un axe également très important à développer par la suite.

Le coût biologique correspond à la perte d'adaptation des animaux résistants à leur environnement en l'absence de la pression de sélection induite par les AVK dans cet environnement. Si le coût biologique est nul, en l'absence d'utilisation d'AVKs, la proportion d'allèles résistants en circulation n'a pas de raison de baisser. En revanche, si ce coût est élevé, alors en l'absence d'utilisation d'AVK, les résistances s'éteindront d'elles-mêmes. Chez le rat brun, ce coût a été évoqué. Il semble que les besoins en vitamine K des rats bruns résistants sont plus importants que ceux des rats bruns sensibles.

Chez la souris, aucun argument de ce type n'a été évoqué dans la littérature pour le moment. Mettre en évidence un tel coût serait très important, comprendre les mécanismes en cause et les principales conséquences de ces coûts permettrait sans doute de mettre en place des stratégies aggravant ces coûts et permettant de faire reculer la résistance.

Finalement, une énigme reste en suspens à la fin de ce travail : comment les souris porteuses à l'état homozygote de la mutation W59G survivent-elles. Leur VKORC1 apparaît inactive et le gène *vkorc1* est très peu transcrit, pourtant nous avons des animaux qui survivent sans apport thérapeutique de vitamine K contrairement aux porteurs du syndrome VKCFD2. Ces animaux

présentent même une activité VKOR importante dans le foie, relativement résistante à la Warfarine.

Par la suite, il serait intéressant d'exprimer la VKORC1 mutée 59G avec un système en cellule, à l'instar des autres équipes travaillant sur VKORC1 en système cellulaire. Cependant, dans notre cas, nous suivrons l'activité VKOR et la production de vitamine K quinone formée. L'objectif étant d'obtenir une cohérence entre notre système d'expression en levure et ce système cellulaire.

De plus, la résistance métabolique, chez ces souris 59G, n'a pas été prise en considération. Nous ne pouvons exclure la possibilité d'une dégradation plus rapide des AVK chez ces souris. Ainsi, une analyse détaillée de l'expression des cytochromes P-450 serait pertinente dans notre population de souris 59G.

Cette énigme est d'autant plus intéressante que dans une étude précédente issue de notre laboratoire, Hodroge et al ont montré que 6 mutations de ce type existent chez l'homme, toutes associées à une résistance phénotypique. Découvrir le gène et l'enzyme catalysant l'activité VKOR chez la souris 59G pourrait fournir une explication à cette résistance phénotypique chez l'homme.

Un séquençage massif des exomes permettrait de répondre à cette interrogation. En effet, en utilisant la lignée de souris 59G introgressées dans des souris CD1, donc avec un fond génétique connu, et en comparant le séquençage des régions codantes entre ces souris 59G CD1 et des souris CD1 WT, nous pourrions en déduire le gène. Cette expérience est de l'ordre du possible car plusieurs sociétés se sont spécialisées dans ce genre de manipulations, cependant cela s'avère pour le moment très onéreux.

## Partie 9 : Annexes

Annexe 1 : Amorces des mutations de *vkorc1* retrouvées chez la souris en France

Mutation	Amorce sens (5' -> 3')	Amorce anti-sens (5' -> 3')	T hybridation (°C)
R12W	CCT GGT TTG GTT TGG TTG GCT TTG TGT	ACA CAA AGC CAA CCA AAC CAA ACC AGG	54,6
W12R	TCA CCT GGA TTG GTC AGA CTT GCT TTG TGT CTT	AAG ACA CAA AGC AAG TCT GAC CAA TCC AGG TGA	58,1
A26S	CTT TCT TTG TAT TCT CTT CAT GTC AAG	CTT GAC ATG AAG AGA ATA CAA AGA AAG	48,6
S26A	TTG TCC CTT TAC GCT CTT CAT GTC AAG	CTT GAC ATG AAG AGC GTA AAG GGA CAA	47,3
A26T	CTT TCT TTG TAT ACT CTT CAT GTC AAG	CTT GAC ATG AAG AGT ATA CAA AGA AAG	48,6
E37G	GCC AGA GAT GGT AAC TAT AGA	TCT ATA GTT ACC ATC TCT GGC	53,1
A48T	GAC GTT GGT ACC ACT ATT TCT TGC TCC	GGA GCA AGA AAT AGT GGT ACC AAC GTC	54,6
T48A	GAC GTT GGT ACT GCT ATT TCT TGC TCC	GGA GCA AGA AAT AGC AGT ACC AAC GTC	45,3
R58G	GTC TTT TCT TCC GGC TGG GGT AGA	TCT ACC CCA GCC GGA AGA AAA GAC	54
W59G	TCT TCC AGA GGT GGT AGA GGA	TCC TCT ACC ACC TCT GGA AGA	57,3
W59L	TTT TCT TCC AGA TTG GGT AGA GGA TTC	GAA TCC TCT ACC CAA TCT GGA AGA AAA	51,6
W59S	TCT TCC AGA TCT GGT AGA GGA	TCC TCT ACC AGA TCT GGA AGA	47,3
R61L	TCC AGA TGG GGT TTG GGA TTC GGT TTG	CAA ACC GAA TCC CAA ACC CCA TCT GGA	59,3
L61R	TCC AGA TGG GGT AGA GGA TTC GGT TTG	CAA ACC GAA TCC TCT ACC CCA TCT GGA	49,2
L124M	CTT GCT TGG ATC ATG TTT TTC GTT CTT	AAG AAC GAA AAA CAT GAT CCA AGC AAG	50,1
L124Q	CTT GCT TGG ATC CAA TTT TTC GTT CTT	AAG AAC GAA AAA TTG GAT CCA AGC AAG	50,1
L128S	TTT TTC GTT TCT TAC GAC TTC	GAA GTC GTA AGA AAC GAA AAA	52,6
Y139C	TGC ATC ACT ACA TGT GCT ATC AAT GTT	AAC ATT GAT AGC ACA TGT AGT GAT GCA	50,1

Annexe 2 : Amorces des gènes des enzymes du cycle de la vitamine K et de la *Gapdh*, le gène de ménage

Gène	Amorce sens (5' -> 3')	Amorce Anti-sens (5' -> 3')
<b><i>Vkorc1</i></b>	TCCCGCGTCTTCTCCTCT	CGTCCCCTCAAGAACCTA
<b><i>Vkorc111</i></b>	CGAGCCAAACAGTGTCTTTGGACTTA	TGTGGTGACGCAGATGATGCAA
<b><i>Ggcx</i></b>	GGACCGAAAATACTTGGATG	GTCCAGGAGAAACACGTACC
<b><i>Nqo1</i></b>	AGGCTGGTTTGGAGAGAGTGC	ATTGGCCAGAGAATGACGTT
<b><i>Gapdh</i></b>	CAGAACATCATCCCTGCATC	CTGCTTCACCACCTTCTTGA



## Partie 10: Bibliographie

---

1. Wu J, Buyantuyev A, Jenerette GD, Litteral J, Neil K, Shen W. Quantifying Spatiotemporal Patterns and Ecological Effects of Urbanization: A Multiscale Landscape Approach. In: Richter thias, Weiland U, editors. Applied Urban Ecology. John Wiley & Sons, Ltd; 2011 p. 33–53.
2. Buckle AP, Smith RH. Rodent Pests and Their Control, 2nd Edition. CABI; 2015. 433 p.
3. Quéré J-P, Louarn HL. Les rongeurs de France: Faunistique et biologie — 3e édition revue et augmentée. Editions Quae; 2011. 318 p.
4. Beauchamp GK, Yamazaki K, Wysocki CJ, Slotnick BM, Thomas L, Boyse EA. Chemosensory recognition of mouse major histocompatibility types by another species. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jun;82(12):4186–8.
5. Matsunami H, Amrein H. Taste and pheromone perception in mammals and flies. Genome Biol. 2003 Jun 30;4(7):220.
6. Salesse R, Gervais R. Odorat et goût: de la neurobiologie des sens chimiques aux applications. Editions Quae; 2012. 574 p.
7. Song Y, Endepols S, Klemann N, Richter D, Matuschka F-R, Shih C-H, *et al.* Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between Old World mice. Curr Biol CB. 2011 Aug 9;21(15):1296–301.
8. Corrigan RM, Moreland D. Rodent Control: A Practical Guide for Pest Management Professionals. G. I. E. Media, Incorporated; 2001. 355 p.
9. Battersby S. Public health policy – can there be an economic imperative? An examination of one such issue . Journal of Environmental Health Research, 2004, Volume 3, issue 1.
10. Moors PJ, Atkinson IAE, Sherley GH. Reducing the rat threat to island birds. Bird Conserv Int. 1992 Jun;2(02):93–114.
11. J. Wilson D, F. Wright E, D. Canham C, A. Ruscoe W. Neighbourhood analyses of tree seed predation by introduced rodents in a New Zealand temperate rainforest. Ecography. 2007 Feb 1;30(1):105–19.
12. Angel A, Wanless RM, Cooper J. Review of impacts of the introduced house mouse on islands in the Southern Ocean: are mice equivalent to rats? Biol Invasions. 2009 Aug;11(7):1743–54.
13. Le Goff J, Biraben J-N. La peste dans de Haut Moyen Âge. Ann Hist Sci Soc. 1969;24(6):1484–510.
14. Beaucournu JC. Diversité des puces vectrices en fonction des foyers pesteux. Bulletin de la société de pathologie exotique. 1999, T92-5bis: 419-421.
15. Adler B, de la Peña Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010 Jan 27;140(3-4):287–96.

16. Levett PN. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clin Appl Immunol Rev*. 2004 Oct;4(6):435–48.
17. Bakoss P, Jareková J, Labuda M. An attempt to control a natural focus of leptospirosis grippotyphosa by rodenticide--a long-term study (1977-2004). *Ann Agric Environ Med AAEM*. 2007;14(1):51–6.
18. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Apr;17(4):494–501.
19. Michel V, Ruvoen-Clouet N, Menard A, Sonrier C, Fillonneau C, Rakotovo F, et al. Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and humans in France. *Eur J Epidemiol*. 2001;17(2):111–21.
20. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol*. 2004 Mar;7(1):35–40.
21. Socolovschi C, Angelakis E, Renvoisé A, Fournier P-E, Marié JL, Davoust B, et al. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int J Infect Dis*. 2011 Oct;15(10):e710–5.
22. Baranton G, Postic D. Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int J Infect Dis*. 2006 Mar;10(2):162–70.
23. Nardone A, Capek I, Baranton G, Campèse C, Postic D, Vaillant V, et al. Risk factors for leptospirosis in metropolitan France: results of a national case-control study, 1999-2000. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004 Sep 1;39(5):751–3.
24. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):296–326.
25. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003 Dec;3(12):757–71.
26. Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. 2010 Sep;5(9):1413–25.
27. Ren S-X, Fu G, Jiang X-G, Zeng R, Miao Y-G, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2003 Apr 24;422(6934):888–93.
28. Nascimento ALTO, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, et al. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. *J Bacteriol*. 2004 Apr 1;186(7):2164–72.
29. Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Prev Vet Med*. 2003 Aug;60(3):227–35.
30. McBride, Alan JA; Athanazio, Daniel A; Reis, Mitermayer G; Ko, Albert I. Leptospirosis : Current Opinion in Infectious Diseases. 2005 Oct, Volume 18, Issue 5, 376–386
31. Maciel EAP, de Carvalho ALF, Nascimento SF, de Matos RB, Gouveia EL, Reis MG, et al. Household Transmission of *Leptospira* Infection in Urban Slum Communities. Picardeau M, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Jan 30;2(1):e154.

32. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Oct;7(10):736–47.
33. Dias JP, Teixeira MG, Costa MCN, Mendes CMC, Guimarães P, Reis MG, et al. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007 Oct;40(5):499–504.
34. Thiermann AB. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *J Wildl Dis*. 1981 Jan;17(1):39–43.
35. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, et al. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009 Dec;32(6):463–76.
36. Gardner-Santana LC, Norris DE, Fornadel CM, Hinson ER, Klein SL, Glass GE. Commensal ecology, urban landscapes, and their influence on the genetic characteristics of city-dwelling Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Mol Ecol*. 2009 Jul;18(13):2766–78.
37. Heyman P, Plyusnina A, Berny P, Cochez C, Artois M, Zizi M, et al. Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2004 Sep [cited 2015 Nov 3];23(9).
38. Ayral F, Artois J, Zilber A-L, Widén F, Pounder KC, Aubert D, et al. The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010–2012). *Epidemiol Infect*. 2015 Feb;143(03):586–99.
39. Verner-Carlsson J, Löhmus M, Sundström K, Strand TM, Verkerk M, Reusken C, et al. First evidence of Seoul hantavirus in the wild rat population in the Netherlands. *Infect Ecol Epidemiol* [Internet]. 2015 Feb 4 [cited 2015 Nov 3];5(0).
40. Gamelin L, Harry P. Rodenticides. *EMC - Toxicol-Pathol*. 2005 Sep;2(3):89–97.
41. Grolleau G. Sensibilité de trois espèces de rongeurs commensaux à la brométhaline, en conditions de laboratoire. *EPPO Bull*. 1988 Sep 1;18(3):469–74.
42. Peterson ME. Bromethalin. *Top Companion Anim Med*. 2013 Feb;28(1):21–3.
43. Balis GU, Monroe RR. The pharmacology of chloralose. A review. *Psychopharmacologia*. 1964 Jul 6;6(1):1–30.
44. Peterson ME, Fluegeman K. Cholecalciferol. *Top Companion Anim Med*. 2013 Feb;28(1):24–7.
45. Doğan E, Güzel A, Çiftçi T, Aycan İ, Çelik F, Çetin B, et al. Zinc Phosphide Poisoning. *Case Rep Crit Care*. 2014;2014:1–3.
46. Ravindran S, Hopkins B, Bova S, Tingle M. In vivo metabolism of norbormide in rats and mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009 Jul;28(1):147–51.
47. Mitchell D, H E, Perry RL. Effects of neophobia and habituation on the poison-induced avoidance of exteroceptive stimuli in the rat. *J Exp Psychol Anim Behav Process*. 1975;1(1):47–55.

48. Butschkau A, Wagner N-M, Genz B, Vollmar B. Protein Z Exerts Pro-Angiogenic Effects and Upregulates CXCR4. PLoS ONE [Internet]. 2014 Dec 4 [cited 2015 Oct 13];9(12).
49. Dam H. Cliv. the Antihæmorrhagic Vitamin of the Chick. Nutr Rev. 1973 Apr 1;31(4):121–121.
50. Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, Watzka M. The vitamin K cycle. Vitam Horm. 2008;78:35–62.
51. Stafford DW. The vitamin K cycle. J Thromb Haemost JTH. 2005 Aug;3(8):1873–8.
52. Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K. Thromb Haemost.2008;100:530–547.
53. Spronk HMH, Soute B a. M, Schurgers LJ, Thijssen HHW, De Mey JGR, Vermeer C. Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. J Vasc Res. 2003 Dec;40(6):531–7.
54. Beulens JWJ, Bots ML, Atsma F, Bartelink M-LEL, Prokop M, Geleijnse JM, et al. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. Atherosclerosis. 2009 Apr;203(2):489–93.
55. L'Alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles. Editions Quæ; 1989. 310 p.
56. Bal dit Sollier C, Drouet L. Vitamine K, antivitamine K et alimentation. Cah Nutr Diététique. 2009 Dec;44(6):273–7.
57. Barkhan P, Shearer MJ. Metabolism of vitamin K1 (phylloquinone) in man. Proc R Soc Med. 1977 Feb;70(2):93–6.
58. 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 Feb 18;7(275):275ra23.
59. 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 Nov 4;468(7320):117–21.
60. Thijssen HHW, Driittij-Reijnders MJ. Vitamin K metabolism and vitamin K1 status in human liver samples: a search for inter-individual differences in warfarin sensitivity. Br J Haematol. 1993 Aug 1;84(4):681–5.
61. Edson KZ, Prasad B, Unadkat JD, Suhara Y, Okano T, Guengerich FP, et al. Cytochrome P450-Dependent Catabolism of Vitamin K:  $\omega$ -Hydroxylation Catalyzed by Human CYP4F2 and CYP4F11. Biochemistry (Mosc). 2013 Nov 19;52(46):8276–85.
62. McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE. CYP4F2 Is a Vitamin K1 Oxidase: An Explanation for Altered Warfarin Dose in Carriers of the V433M Variant. Mol Pharmacol. 2009 Jun 1;75(6):1337–46.
63. Mizushina Y, Maeda J, Irino Y, Nishida M, Nishiumi S, Kondo Y, et al. Effects of Intermediates between Vitamins K2 and K3 on Mammalian DNA Polymerase Inhibition and Anti-Inflammatory Activity. Int J Mol Sci. 2011 Feb 10;12(2):1115–32.

64. Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, et al. Novel Role of Vitamin K in Preventing Oxidative Injury to Developing Oligodendrocytes and Neurons. *J Neurosci*. 2003 Jul 2;23(13):5816–26.
65. Mukai K, Itoh S, Morimoto H. Stopped-flow kinetic study of vitamin E regeneration reaction with biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K, and tocopherolquinone) in solution. *J Biol Chem*. 1992 Nov 5;267(31):22277–81.
66. Lev M, Milford AF. Effect of vitamin K depletion and restoration on sphingolipid metabolism in *Bacteroides melaninogenicus*. *J Lipid Res*. 1972 May;13(3):364–70.
67. Thomas DDH, Krzykowski KJ, Engelke JA, Groblewski GE. Exocrine pancreatic secretion of phospholipid, menaquinone-4, and caveolin-1 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 2;319(3):974–9.
68. Koshihara Y, Hoshi K, Shiraki M. Vitamin K2 (menatetrenone) inhibits prostaglandin synthesis in cultured human osteoblast-like periosteal cells by inhibiting prostaglandin H synthase activity. *Biochem Pharmacol*. 1993 Oct 19;46(8):1355–62.
69. Shea MK, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Dallal GE, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, et al. Vitamin K supplementation and progression of coronary artery calcium in older men and women. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jun;89(6):1799–807.
70. Braam LAJLM, Hoeks APG, Brouns F, Hamulyák K, Gerichhausen MJW, Vermeer C. Beneficial effects of vitamins D and K on the elastic properties of the vessel wall in postmenopausal women: a follow-up study. *Thromb Haemost*. 2004 Feb;91(2):373–80.
71. Suttie JW, Esmon CT, Grant GA, Sadowski JA. Proceedings: In vitro prothrombin synthesis--the vitamin K-dependent carboxylation of a prothrombin precursor. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975 Nov 15;34(2):561–2.
72. Wu SM, Morris DP, Stafford DW. Identification and purification to near homogeneity of the vitamin K-dependent carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 15;88(6):2236–40.
73. Berkner KL. Vitamin K-dependent carboxylation. *Vitam Horm*. 2008;78:131–56.
74. 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 Sep;82(18):6109–13.
75. Huber P, Schmitz T, Griffin J, Jacobs M, Walsh C, Furie B, et al. Identification of amino acids in the gamma-carboxylation recognition site on the propeptide of prothrombin. *J Biol Chem*. 1990 Jul 25;265(21):12467–73.
76. Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-Dependent Biosynthesis of  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid. *Blood*. 1999 Mar 15;93(6):1798–808.
77. Bouchard BA, Furie B, Furie BC. Glutamyl substrate-induced exposure of a free cysteine residue in the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase is critical for vitamin K epoxidation. *Biochemistry (Mosc)*. 1999 Jul 20;38(29):9517–23.
78. Rishavy MA, Hallgren KW, Yakubenko AV, Shtofman RL, Runge KW, Berkner KL. Brønsted analysis reveals Lys218 as the carboxylase active site base that deprotonates vitamin K

- hydroquinone to initiate vitamin K-dependent protein carboxylation. *Biochemistry (Mosc)*. 2006 Nov 7;45(44):13239–48.
79. Knobloch JE, Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the “propeptide” region of factor X. *J Biol Chem*. 1987 Nov 15;262(32):15334–7.
  80. Soute BA, Ulrich MM, Watson AD, Maddison JE, Ebberink RH, Vermeer C. Congenital deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors due to a defective vitamin K-dependent carboxylase in Devon Rex cats. *Thromb Haemost*. 1992 Nov 10;68(5):521–5.
  81. Sakata Y, Loskutoff DJ, Gladson CL, Hekman CM, Griffin JH. Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor. *Blood*. 1986 Dec 1;68(6):1218–23.
  82. Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H, et al. Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res*. 2004 Jul 9;95(1):34–41.
  83. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of Endothelial Cell Protease Activated Receptor 1 by the Protein C Pathway. *Science*. 2002 Jun 7;296(5574):1880–2.
  84. Rosing J, Maurissen LFA, Tchaikovski SN, Tans G, Hackeng TM. Protein S is a cofactor for tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res*. 2008;122 Suppl 1:S60–3.
  85. Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost JTH*. 2004 Dec;2(12):2118–32.
  86. Broze GJ, Miletich JP. Human Protein Z. *J Clin Invest*. 1984 Apr;73(4):933–8.
  87. Sofi F, Cesari F, Pratesi G, Cellai AP, Pulli R, Pratesi C, et al. Low protein Z levels in patients with peripheral arterial disease. *Thromb Haemost*. 2007 Nov;98(5):1114–7.
  88. Butschkau A, Wagner N-M, Bierhansl L, Genz B, Vollmar B. Protein Z-deficiency is associated with enhanced neointima formation and inflammatory response after vascular injury in mice. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Aug 15;7(9):6064–71.
  89. Kulman JD, Harris JE, Haldeman BA, Davie EW. Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich gamma-carboxyglutamic acid proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9058–62.
  90. Kulman JD, Harris JE, Xie L, Davie EW. Identification of two novel transmembrane  $\gamma$ -carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 13;98(4):1370–5.
  91. Viegas CSB, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, João A, Williamson MK, et al. Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. *Am J Pathol*. 2009 Dec;175(6):2288–98.
  92. Merle B, Garnero P. The multiple facets of periostin in bone metabolism. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2012 Apr;23(4):1199–212.



93. Coutu DL, Wu JH, Monette A, Rivard G-E, Blostein MD, Galipeau J. Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):17991–8001.
94. Snider P, Standley KN, Wang J, Azhar M, Doetschman T, Conway SJ. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res*. 2009 Nov 6;105(10):934–47.
95. Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*. 1988 Sep 9;54(6):787–93.
96. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (*gas6*) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol*. 1993 Aug;13(8):4976–85.
97. Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, et al. Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1996 Mar 15;16(6):2012–9.
98. Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, Tai L-K, Jin Z-G, Haendeler J, et al. Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Oct;37(4):881–7.
99. Stenhoff J, Dahlbäck B, Hafizi S. Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 2;319(3):871–8.
100. Fridell YW, Villa J, Attar EC, Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1998 Mar 20;273(12):7123–6.
101. Motomura H, Niimi H, Sugimori K, Ohtsuka T, Kimura T, Kitajima I. Gas6, a new regulator of chondrogenic differentiation from mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun 15;357(4):997–1003.
102. Hung Y-J, Lee C-H, Chu N-F, Shieh Y-S. Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care*. 2010 Aug;33(8):1840–4.
103. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):327–36.
104. Wu K-S, Hung Y-J, Lee C-H, Hsiao F-C, Hsieh P-S. The Involvement of GAS6 Signaling in the Development of Obesity and Associated Inflammation. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:202513.
105. Augustine KA, Rossi RM, Van G, Housman J, Stark K, Danilenko D, et al. Noninsulin-dependent diabetes mellitus occurs in mice ectopically expressing the human Axl tyrosine kinase receptor. *J Cell Physiol*. 1999 Dec;181(3):433–47.
106. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Dec 28;117(3):765–71.
107. Fraser JD, Price PA. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein

- and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *J Biol Chem.* 1988 Aug 15;263(23):11033–6.
108. Price PA, Rice JS, Williamson MK. Conserved phosphorylation of serines in the Ser-X-Glu/Ser(P) sequences of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from shark, lamb, rat, cow, and human. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 1994 May;3(5):822–30.
  109. Luo G, Ducy 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 Mar 6;386(6620):78–81.
  110. Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost JTH.* 2003 Jan;1(1):178–85.
  111. Wallin R, Cain D, Hutson SM, Sane DC, Loeser R. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost.* 2000 Dec;84(6):1039–44.
  112. Nishimoto SK, Nishimoto M. Matrix Gla protein C-terminal region binds to vitronectin. Co-localization suggests binding occurs during tissue development. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2005 Aug;24(5):353–61.
  113. Stehbens WE. The significance of programmed cell death or apoptosis and matrix vesicles in atherogenesis. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr.* 2000 Feb;46(1):99–110.
  114. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996 Aug 1;382(6590):448–52.
  115. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* 2007 Aug 10;130(3):456–69.
  116. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 1;105(13):5266–70.
  117. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):211–25.
  118. Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, et al. Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. *Cell.* 2010 Jul 23;142(2):309–19.
  119. Teixeira CC, Liu Y, Thant LM, Pang J, Palmer G, Alikhani M. Foxo1, a novel regulator of osteoblast differentiation and skeletogenesis. *J Biol Chem.* 2010 Oct 1;285(40):31055–65.
  120. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003 Aug;4(8):638–49.
  121. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, et al. Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell.* 2010 Jul 23;142(2):296–308.



122. Chatrou MLL, Reutelingsperger CP, Schurgers LJ. Role of vitamin K-dependent proteins in the arterial vessel wall. *Hämostaseologie*. 2011 Nov;31(4):251–7.
123. Bell RG, Matschiner JT. Vitamin K activity of phylloquinone oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1970 Dec;141(2):473–6.
124. 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 Feb 5;427(6974):537–41.
125. 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 Feb 5;427(6974):541–4.
126. Robertson HM. Genes encoding vitamin-K epoxide reductase are present in *Drosophila* and trypanosomatid protists. *Genetics*. 2004 Oct;168(2):1077–80.
127. Moreau C, Lorient M-A, Siguret V. Vitamin K antagonists: from discovery to pharmacogenetics. *Ann Biol Clin (Paris)*. 20129-10;(5):539–51.
128. Spohn G, Kleinridders A, Wunderlich FT, Watzka M, Zaucke F, Blumbach K, et al. VKORC1 deficiency in mice causes early postnatal lethality due to severe bleeding. *Thromb Haemost*. 2009 Jun;101(6):1044–50.
129. Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, Rapoport TA. Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):507–12.
130. Watzka M, Geisen C, Bevans CG, Sittlinger 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 Jan 1;9(1):109–18.
131. Goodstadt L, Ponting CP. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci*. 2004 Jun;29(6):289–92.
132. Rost S, Fregin A, Hünnerberg 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 Oct;94(4):780–6.
133. 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 Jun 19;46(24):7279–83.
134. Rishavy MA, Usubalieva A, Hallgren KW, Berkner KL. Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *J Biol Chem*. 2011 Mar 4;286(9):7267–78.
135. Silverman RB. Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase. *J Am Chem Soc*. 1981 Sep 1;103(19):5939–41.
136. Westhofen P, Watzka M, Marinova M, Hass M, Kirfel G, Müller J, et al. Human Vitamin K 2,3-Epoxide Reductase Complex Subunit 1-like 1 (VKORC1L1) Mediates Vitamin K-dependent Intracellular Antioxidant Function. *J Biol Chem*. 2011 Apr 29;286(17):15085–94.

137. Hamed A, Matagrini 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. *J Biol Chem*. 2013 Oct 4;288(40):28733–42.
138. Caspers M, Czogalla KJ, Liphardt K, Müller J, Westhofen P, Watzka M, et al. Two enzymes catalyze vitamin K 2,3-epoxy reductase activity in mouse: VKORC1 is highly expressed in exocrine tissues while VKORC1L1 is highly expressed in brain. *Thromb Res*. 2015 May;135(5):977–83.
139. Fasco MJ, Principe LM. Vitamin K1 hydroquinone formation catalyzed by DT-diaphorase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982 Jan 15;104(1):187–92.
140. Ingram BO, Turbyfill JL, Bledsoe PJ, Jaiswal AK, Stafford DW. Assessment of the contribution of NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to the reduction of vitamin K in wild-type and NQO1-deficient mice. *Biochem J*. 2013 Nov 15;456(1):47–54.
141. Schofield FW. A Brief Account of a Disease in Cattle Simulating Hemorrhagic Septicaemia due to Feeding Sweet Clover. *Can Vet J Rev Vét Can*. 1984 Dec;25(12):453–5.
142. Link KP. The discovery of dicumarol and its sequels. *Circulation*. 1959 Jan;19(1):97–107.
143. Overman RS, Stahmann MA, Huebner CF, Sullivan WR, Spero L, Doherty DG, et al. Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease Xiii. Anticoagulant Activity and Structure in the 4-Hydroxycoumarin Group. *J Biol Chem*. 1944 Apr 1;153(1):5–24.
144. Sadler JE. Medicine: K is for koagulation. *Nature*. 2004 Feb 5;427(6974):493–4.
145. Martin-Bouyer G, Khanh NB, Linh PD, Hoa DQ, Tuan LC, Tourneau J, et al. Epidemic of haemorrhagic disease in Vietnamese infants caused by warfarin-contaminated talcs. *Lancet Lond Engl*. 1983 Jan 29;1(8318):230–2.
146. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral Anticoagulant Therapy. *Chest*. 2012 Feb;141(2 Suppl):e44S – e88S.
147. Aral H, Usta M, Cilingirturk AM, Inal BB, Bilgi PT, Guvenen G. Verifying reference intervals for coagulation tests by using stored data. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011 Dec;71(8):647–52.
148. Eriksson N, Wadelius M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? *Pharmacogenomics*. 2012 Mar 1;13(4):429–40.
149. Hou J-W. Fetal warfarin syndrome. *Chang Gung Med J*. 2004 Sep;27(9):691–5.
150. Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes p-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. *Biochemistry (Mosc)*. 1982 Nov 9;21(23):6019–30.
151. Ishizuka M, Tanikawa T, Tanaka KD, Heewon M, Okajima F, Sakamoto KQ, et al. Pesticide resistance in wild mammals--mechanisms of anticoagulant resistance in wild rodents. *J Toxicol Sci*. 2008 Aug;33(3):283–91.

152. 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*. 2005;19(6):379–85.
153. Fasco MJ, Preusch PC, Hildebrandt E, Suttie JW. Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin-resistant rats. *J Biol Chem*. 1983 Apr 10;258(7):4372–80.
154. Gebauer M. Synthesis and structure–activity relationships of novel warfarin derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2007 Mar 15;15(6):2414–20.
155. Thijssen HHW. Warfarin-based rodenticides: Mode of action and mechanism of resistance. *Pestic Sci*. 1995 Jan 1;43(1):73–8.
156. Atterby H, Kerins GM, MacNicoll AD. Whole-carcass residues of the rodenticide difenacoum in anticoagulant-resistant and -susceptible rat strains (*Rattus norvegicus*). *Environ Toxicol Chem SETAC*. 2005 Feb;24(2):318–23.
157. Rattner BA, Lazarus RS, Elliott JE, Shore RF, van den Brink N. Adverse Outcome Pathway and Risks of Anticoagulant Rodenticides to Predatory Wildlife. *Environ Sci Technol*. 2014 Aug 5;48(15):8433–45.
158. Jacquot M, Coeurdassier M, Couval G, Renaude R, Pleydell D, Truchetet D, et al. Using long-term monitoring of red fox populations to assess changes in rodent control practices. *J Appl Ecol*. 2013 Dec 1;50(6):1406–14.
159. Proulx G, MacKenzie N. Relative abundance of American badger (*Taxidea taxus*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in landscapes with high and low rodenticide poisoning levels. *Integr Zool*. 2012 Mar;7(1):41–7.
160. Geduhn A, Jacob J, Schenke D, Keller B, Kleinschmidt S, Esther A. Relation between Intensity of Biocide Practice and Residues of Anticoagulant Rodenticides in Red Foxes (*Vulpes vulpes*). Spanoghe P, editor. *PLOS ONE*. 2015 Sep 29;10(9):e0139191.
161. Caloni F, Cortinovis C, Rivolta M, Davanzo F. Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *Sci Total Environ*. 2016 Jan 1;539:331–6.
162. Boyle CM. Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons. *Nature*. 1960 Nov 5;188(4749):517–517.
163. Dodsworth E. Mice are spreading despite such poisons as warfarin. *Minic Engin Lond*. 1961;
164. 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 Aug;170(4):1839–47.
165. Rowe FP, Plant CJ, Bradfield A. Trials of the anticoagulant rodenticides bromadiolone and difenacoum against the house mouse (*Mus musculus* L.). *J Hyg (Lond)*. 1981 Oct;87(2):171–7.
166. Greaves JH, Shepherd DS, Quy R. Field trials of second-generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations. *J Hyg (Lond)*. 1982 Oct;89(2):295–301.
167. Greaves J. Resistance to anticoagulant rodenticide. *Cab International*. 1994;
168. Martin AD, Steed LC, Redfern R, Gill JE, Huson LW. Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Lab Anim*. 1979 Jul 1;13(3):209–14.

169. Greaves JH, Ayres P. Heritable resistance to warfarin in rats. *Nature*. 1967 Aug 19;215(5103):877–8.
170. Greaves JH, Ayres PB. Multiple allelism at the locus controlling warfarin resistance in the Norway rat. *Genet Res*. 1982 Aug;40(1):59–64.
171. Kohn MH, Pelz HJ. Genomic assignment of the warfarin resistance locus, *Rw*, in the rat. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc*. 1999 Jul;10(7):696–8.
172. Kohn MH, Pelz HJ. A gene-anchored map position of the rat warfarin-resistance locus, *Rw*, and its orthologs in mice and humans. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1996–8.
173. Kohn MH, Pelz H-J, Wayne RK. Locus-specific genetic differentiation at *Rw* among warfarin-resistant rat (*Rattus norvegicus*) populations. *Genetics*. 2003 Jul;164(3):1055–70.
174. 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.
175. 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 Mar;66(3):270–6.
176. 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 Oct;19(10):742–50.
177. 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 Feb 1;68(2):254–9.
178. 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 Fate Foreign Compd Biol Syst*. 2001 Jul;31(7):399–407.
179. 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 Jan 1;35(1):62–6.
180. Izzo AA. Herb–drug interactions: an overview of the clinical evidence. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005 Feb 1;19(1):1–16.
181. Wallin R, Hutson SM, Cain D, Sweatt A, Sane DC. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2001 Nov;15(13):2542–4.
182. Thijssen HHW, Janssen CAT, Mosterd JJ. Warfarin resistance: biochemical evaluation of a warfarin-resistant wild brown rat. *Biochem Pharmacol*. 1989 Sep 15;38(18):3129–32.
183. 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 Bio*. 2013 Feb 16;3:144–50.

184. Markussen MD, Heiberg A-C, Nielsen R, Leirs H. Vitamin K requirement in Danish anticoagulant-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Pest Manag Sci*. 2003 Aug 1;59(8):913–20.
185. Kohn MH, Price RE, Pelz H-J. A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant *Vkorc1* mutant rats. *Artery Res*. 2008 Nov;2(4):138–47.
186. Jacob J, Endepols S, Pelz H-J, Kampling E, Cooper TG, Yeung CH, et al. Vitamin K requirement and reproduction in bromadiolone-resistant Norway rats. *Pest Manag Sci*. 2012 Mar 1;68(3):378–85.
187. Tishler M, Fieser LF, Wendler NL. Hydro, Oxido and Other Derivatives of Vitamin K1 and Related Compounds. *J Am Chem Soc*. 1940 Oct 1;62(10):2866–71.
188. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
189. 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 Nov;515(1-2):14–20.
190. Lasseur R, Grandemange A, Longin-Sauvageon C, Berny P, Benoit E. Comparison of the inhibition effect of different anticoagulants on vitamin K epoxide reductase activity from warfarin-susceptible and resistant rat. *Pestic Biochem Physiol*. 2007 Jun;88(2):203–8.
191. Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem*. 2004 Jun 11;279(24):25276–83.
192. 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 Mar 1;64(3):239–48.