



HAL
open science

Intérêt et exploration des marqueurs cliniques et biologiques de la toxicité primaire et secondaire des rodenticides anticoagulants

Meg-Anne Moriceau

► **To cite this version:**

Meg-Anne Moriceau. Intérêt et exploration des marqueurs cliniques et biologiques de la toxicité primaire et secondaire des rodenticides anticoagulants. Toxicologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1319 . tel-03774085

HAL Id: tel-03774085

<https://theses.hal.science/tel-03774085>

Submitted on 9 Sep 2022

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 : 2021LYSE1319

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale EDISS, N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé

Spécialité de doctorat : Science de la vie, biologie, Santé

Soutenue publiquement le 14/12/2021, par :

Meg-Anne MORICEAU

Intérêt et exploration des marqueurs cliniques et biologiques de la toxicité primaire et secondaire des rodenticides anticoagulants

Devant le jury composé de :

		Président
Mme Martine KAMMERER	Professeur en Toxicologie Animale et Environnementale, ONIRIS	Rapporteuse
M. Claude PETIT	Professeur en Pharmacie – Toxicologie, ENVT	Rapporteur
Mme Gaud DERVILLY-PINEL	Docteur, HDR, responsable scientifique – LABERCA Nantes	Examinatrice
M. Francois MION	Professeur en Pharmacie, Université de Lyon 1	Président du jury
M. Pascal SANDERS	Directeur scientifique, Anses	Examineur
M. Etienne BENOIT	Professeur de biochimie, VetAgro Sup	Directeur de thèse
Mme Virginie LATTARD	Directeur de recherche, INRA-Vetagro Sup	Co-directrice de thèse
M. Rafael MATEO	Professeur, Université de Castilla-La Mancha	Membre invité
M. Sébastien Lefebvre	Maître de conférence, Vetagro sup	Membre invité

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

A Madame le Professeur Martine KAMMERER et Monsieur le Professeur Claude PETIT, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de rapporter cette thèse et de consacrer du temps à la relecture de mon manuscrit, hommages respectueux. Pr KAMMERER, j'éprouve une grande fierté à pouvoir évoluer dans vos traces au sein d'ONIRIS, et je ferai de mon mieux pour être digne de vous succéder.

A Madame le Docteur Gaud DERVILLY-PINEL, Monsieur le Professeur François MION et Monsieur le Docteur Pascal SANDERS, pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse, sincères remerciements.

A mes encadrants sur ce travail, Madame le Docteur Virginie LATTARD, Monsieur le Professeur Etienne BENOIT, et Monsieur le Docteur Sébastien LEFEBVRE, toute ma gratitude pour m'avoir permis de mener jusqu'au bout cette thèse au cadre plutôt inhabituel, loin de votre laboratoire. Mes remerciements les plus profonds spécialement au Docteur Virginie LATTARD, pour m'avoir poussée à entreprendre ce défi malgré mon départ de Lyon vers de nouveaux horizons professionnels, pour avoir été présente et disponible à chaque gros « rush » de corrections et de soumissions d'article, pour les collaborations intéressantes que ce travail m'a permis d'établir.

A Monsieur le Professeur Rafael Mateo, grand spécialiste de l'écotoxicologie des rodenticides anticoagulants : c'est un immense honneur de vous compter dans mon jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Barnett Rattner, de l'USGS, pour sa collaboration des plus enrichissantes sur deux des publications rattachées à ce travail. Travailler avec vous a été un grand honneur.

A Monsieur le Professeur Hervé POULIQUEN, pour son accompagnement et ses précieux conseils tout au long de mon cursus vétérinaire et de mon début de carrière professionnelle. Je suis ravie que nous soyons collègues désormais.

A ma famille : mes parents, mes grands-parents, mes sœurs Alexandra, Maëva et Jade, pour leur soutien tout au long de ce travail, même si je sais bien que vous n'avez pas vraiment compris pourquoi je faisais « encore » une thèse après la thèse d'exercice vétérinaire !

A Yann, pour avoir cru en moi et en ma capacité à mener ce travail jusqu'au bout malgré les contraintes, pour m'avoir poussée à m'y mettre sérieusement dans les moments de démotivation, pour m'avoir suivie sans réserve dans mon projet d'enseignement-recherche, et juste pour ta présence à mes côtés au quotidien. Tu es mon meilleur ami et mon partenaire dans tous nos projets futurs, et je suis vraiment heureuse de construire ma vie à tes côtés. Je t'aime.

A mes amis, anciens de prépa et de véto, pour enrichir ma vie par votre affection sans faille : vous êtes comme une deuxième famille pour moi. Contrairement à la thèse vétérinaire, j'ai décidé d'être concise dans ces remerciements et de ne pas faire une liste à la Prévert, mais comme dirait si bien Clément, « je suis vraiment contente » de vous avoir auprès de moi.

Table des matières

Remerciements	5
Table des figures.....	13
Table des tableaux.....	15
Liste des publications	17
Liste des abréviations	19
Résumé.....	21
I.INTRODUCTION GENERALE	25
II.CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	27
II.1.Les rodenticides anticoagulants : usages et propriétés	27
II.1.1. Enjeux de la lutte contre les rongeurs nuisibles.....	27
II.1.2. Les rodenticides anticoagulants, des molécules prépondérantes dans la lutte chimique contre les rongeurs nuisibles.....	30
II.1.3. La vitamine K, cible de l'action des rodenticides anticoagulants.....	37
II.1.4. Différences de sensibilité et résistance aux rodenticides anticoagulants	50
II.2. Ecotoxicité des rodenticides anticoagulants : voies d'exposition chez la faune non-cible, mitigation du risque et diagnostic des intoxications.....	54
II.2.1. Caractérisation de l'exposition de la faune non-cible.....	54
II.2.2. Exposition de la faune domestique aux rodenticides anticoagulants.....	54
II.2.3. Exposition de la faune sauvage non-cible aux rodenticides anticoagulants.....	57
II.2.4. Quelles mesures de mitigation du risque d'exposition de la faune non-cible ?	61
II.3. Quels marqueurs potentiels de la toxicité des rodenticides anticoagulants ?	67
II.3.1. Le tableau clinique, premier indicateur de la toxicité des rodenticides ?	67
II.3.2. D'autres biomarqueurs pour mieux caractériser la toxicité des rodenticides anticoagulants ?	70
III.OBJECTIFS DE LA THESE ET STRATEGIES MISES EN PLACE	103
IV.RESULTATS	107
IV.1. Etude d'une intoxication primaire chez des brebis laitières.....	107

IV.1.1. Objectifs	107
IV.1.2. Méthodes	107
IV.1.3. Principaux résultats.....	108
IV.2. Ecotoxicité des AVK et impacts sur la faune sauvage non-cible : étude de l'exposition secondaire de rapaces collectés en France	143
IV.2.1. Objectifs	143
IV.2.2. Méthodes	143
IV.2.3. Principaux résultats.....	144
IV.3. Etude préliminaire de la vitamine K comme marqueur candidat des intoxications aux AVK.	187
IV.3.1. Objectifs	187
IV.3.2. Méthodes	188
IV.3.3. Résultats.....	191
IV.3.4. Discussion.....	201
V.DISCUSSION.....	215
V.1. Quels critères d'évaluation de la pertinence d'un marqueur de la toxicité des AVK ?	215
V.2. Une définition complexe de la toxicité des rodenticides anticoagulants	220
V.2.1. Le tableau clinique, à la base du diagnostic de la toxicité des AVK ?	221
V.2.2. L'exploration de la coagulation, un « gold standard » du diagnostic de l'intoxication ?..	223
V.2.3. Quantification des résidus d'AVK dans les tissus : biomarqueur d'exposition, mais aussi d'effet ?	224
V.2.4. Vers une meilleure caractérisation de la toxicité des AVK ?.....	227
V.3. La vitamine K, une piste prometteuse pour caractériser la toxicité des AVK ?	227
V.3.1. Evolution des formes réduites et oxydées de la vitamine K1 dans les tissus chez le rat...	228
V.3.2. Evolution des formes réduites et oxydées de MK4 dans les tissus chez le rat	229
VI.CONCLUSION.....	233
VII. REFERENCES	237
VIII.ANNEXES	251
VIII.2. Résumé EVPMC 2019	251

VIII.2. Résumé JEDISS 2020 252

Table des figures

Figure 1: Structure chimiques de base des AVKs.	32
Figure 2: Structure chimique des rodenticides anticoagulants de première génération.	32
Figure 3 : Structure chimique des rodenticides anticoagulants de seconde génération.....	33
Figure 4 : structure des vitamères de la vitamine K.....	38
Figure 5 : Les voies de la coagulation (tirée de Hammed 2013)	44
Figure 6: La réaction de gamma-carboxylation (tirée de Hammed 2013)	45
Figure 7 : Le cycle de la vitamine K	49
Figure 8: Alignement de séquences de l'enzyme VKORC1 de 15 espèces pouvant potentiellement être la cible des AVK	51
Figure 9: Espèces concernées par les appels au CNITV relatifs à une exposition aux AVK, sur la période 2008-2017 (%) (extrait de Lefebvre et al., 2017)	56
Figure 10 : Voies d'exposition des rapaces aux AVK (extrait de Nakayama et al. 2019).....	59
Figure 11: Utilisation de la lutte intégrée pendant le cycle de croissance d' <i>Arvicola terrestris</i> (Giraudoux et al., 2012).....	64
Figure 12 : Stratégies mises en place	105
Figure 13: Distribution des concentrations en chlorophacinone dans le plasma et TQ à J3 et J11....	109
Figure 14 : Evolution du TQ en fonction de la concentration en chlorophacinone dans le plasma (gauche) et le lait (droite).....	110
Figure 15 : Evolution des concentrations en chlorophacinone dans le lait en fonction du temps.....	111
Figure 16 : Fréquence de détection de chaque AVK pour chaque période.	146
Figure 17 : Concentrations hépatiques en MK4, K1 et leurs formes oxydées selon la supplémentation	193
Figure 18: Evolution des concentrations hépatiques des différents vitamères (en ng/g) en fonction du jour post intoxication volontaire à la bromadiolone.....	196
Figure 19 : Evolution des concentrations pulmonaires des différents vitamères (en ng/g) en fonction du jour post intoxication volontaire à la bromadiolone..	198
Figure 20 : Evolution des concentrations rénales des différents vitamères (en ng/g) en fonction du jour post intoxication volontaire à la bromadiolone.....	200
Figure 21 : Evolution de la bromadiolone dans le foie (à gauche) et dans le rein (à droite), en fonction du temps.....	201
Figure 22: Evolution du rapport forme oxydée/forme réduite pour MK4 et K1 dans le foie (A), le poumon (B) et le rein (C), en fonction du temps.	211
Figure 23 : Chemin des effets adverses (AOP) (traduit de Barnett et al., 2014).....	218

Table des tableaux

Tableau 1 : Demi-vie hépatiques des AVK chez le rat et la souris.....	36
Tableau 2 : les facteurs de coagulation	41
Tableau 3: Les PVKD et leurs fonctions (adapté de Ferland 2012)	46
Tableau 4 : Biomarqueurs potentiels pour évaluer l'exposition et les effets des AVK chez la faune ...	72
Tableau 5 : Concentrations en chlorophacinone dans le lait	111
Tableau 6: Niveaux d'AVK et lésions hémorragiques chez les individus suspectés d'intoxication aux AVK	148
Tableau 7 : concentrations hépatiques en MK4, K1 et leurs formes oxydées selon la supplémentation (en ng/g MF).....	192
Tableau 8: Concentrations dans le foie (en ng/g MF) des différents vitamères de la vitamine K, en fonction du jour d'intoxication à la bromadiolone	195
Tableau 9 : Concentrations dans le poumon (en ng/g MF) des différents vitamères de la vitamine K, en fonction du jour d'intoxication à la bromadiolone.....	197
Tableau 10 : Concentrations dans le rein (en ng/g MF) des différents vitamères de la vitamine K, en fonction du jour d'intoxication à la bromadiolone	199
Tableau 11 : Ratios « basaux » entre les concentrations en formes oxydées et réduites pour MK4 et K1 selon différentes conditions de supplémentation (étude A)	208
Tableau 12 : Tableau de contingence adapté aux marqueurs de la toxicité des AVK	219

Liste des publications

Publications dans des revues à comité de lecture :

Articles publiés:

1/ Rached, A., **Moriceau, M.-A.**, Serfaty, X., Lefebvre, S., Lattard, V., 2020. Biomarkers potency to monitor non-target fauna poisoning by anticoagulant rodenticides. *Front. Vet. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.616276>

2/ **Moriceau, M.-A.**, Lefebvre, S., Fourel, I., Benoit, E., Rattner, B.A., Lattard, V., 2020. Accidental chlorophacinone exposure of lactating ewes: Clinical follow-up and human health dietary implications. *Food Chem. Toxicol.* 143, 111518. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111518>

Articles soumis:

3/ / **Moriceau, M.-A.**, Lefebvre, S., Fourel, I., Benoit, E., Buronfosse F., Orabi P., Rattner, B.A., Lattard, V., 2021. Exposure of predatory and scavenging birds to anticoagulant rodenticides in France: exploration of data from French surveillance programs.

Soumis le 19 juillet 2021 à la revue Science of the Total Environment, révisions reçues le 27 août, version corrigée renvoyée le 23 septembre.

Articles à soumettre:

-

Communications dans des conférences nationales et internationales :

- **Moriceau, M.-A.**, Chlorophacinone exposure in milking ewes – residues in milk and human health issues. *12th European vertebrate pest management*, Sep 2019, Clermont Ferrand, France.

- **Moriceau, M.-A.**, Lefebvre, S., Fourel, I., Benoit, E., Rattner, B.A., Lattard, V., Anticoagulant rodenticide poisoning in lactating ewes: exploration of intoxication markers and human health dietary implications. *25ème Journée Scientifique de l'EDISS*, Nov 2020, Lyon, France.

Liste des abréviations

ALAD : Acide Delta-Aminolévulinique Déshydratase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

AOP : Adverse Outcome Pathway (voie des effets indésirables)

AVK : Anti-vitaminique K

BPR : Biocidal Product Regulation (Règlement européen sur les biocides)

Ca : Calcium

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

CMR : Cancérogène Mutagène Reprotoxique

CNITV : Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires

DE50 : Dose Efficace 50

DJA : Dose Journalière Admissible

DL50 : Dose Létale 50

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FC : Facteur de Coagulation

FDR : False Discovery Rate (Taux de fausses découvertes)

FP3 : Facteur Plaquettaire 3

FT : Facteur Tissulaire

Glu : Glutamate

GRP : Gla-Rich Protein

IPM : Integrated Pest Management (Gestion intégrée des nuisibles)

K1ox : Vitamine K1 oxydée

LC – MS/MS : Chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem

LPO : Ligue de Protection des Oiseaux

LOQ : Limite de quantification

MF : Matière fraîche

MGP : Matrix-Gla Protein

MK : Ménaquinone

MK4ox : Ménaquinone-4 oxydée

NOAEL : Dose sans effet adverse observé

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

PBPK : Pharmacocinétique basée sur la physiologie

PBT : Persistant, Bioaccumulable, Toxique

PDF : Produit de Dégradation de la Fibrine

PIVKA : Protéine Induite par l'Absence ou l'Antagonisme de la Vitamine K

PVKD : Protéine Vitamine K Dépendante

RVVT : Temps de Venin de Vipère de Russel

SC : Sous-Cutané

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

TCA : Temps de Céphaline Activée

TQ : Temps de Quick

US-EPA : Agence gouvernementale de protection de l'environnement des Etats-Unis

VKORC1 : Vitamin K Epoxyde Reductase C1

VPP : Valeur Prédicative Positive

vPvB : Très Persistant, Très Bioaccumulable

Résumé

L'usage ubiquitaire des pesticides est une problématique sociétale d'actualité. Parmi ces pesticides, les rodenticides anticoagulants sont des produits prépondérants dans la lutte chimique contre les rongeurs nuisibles. Leur action sur le recyclage de la vitamine K entraîne des anomalies de la coagulation et une mort différée des suites d'hémorragies chez les individus contaminés. Ces anti-vitaminiques K (AVK) sont largement utilisés depuis les années 50, et l'émergence de phénomènes de résistance chez certains rongeurs a nécessité le développement de plusieurs générations de molécules, les dernières générations étant particulièrement persistantes et bioaccumulables dans les organismes. Cela entraîne des problématiques de toxicité et d'écotoxicité de ces molécules, avec un risque majeur d'exposition des populations non-cibles. Il convient donc de distinguer exposition environnementale aux rodenticides, et intoxication réelle : ainsi, comment caractériser au mieux la toxicité des AVK ? L'objectif principal de ce travail a été de tenter d'apporter des pistes de réponses à cette question.

Une revue critique de la littérature existante sur les différents marqueurs potentiels disponibles a été l'occasion de proposer une liste critères permettant d'évaluer la pertinence de ces marqueurs, comme leur stade de développement, leur utilisation pour des investigations *ante* ou *post-mortem*, les interférences possibles entre le marqueur et un traitement antidotique à la vitamine K, leur significativité toxicologique, ou encore leur sensibilité et spécificité. Ces critères ont été repris par la suite pour discuter des marqueurs testés dans les études sur le terrain.

L'évaluation de la pertinence de certains marqueurs déjà existants sur le terrain s'est faite par le biais de deux études. La première, sur une exposition primaire de brebis laitières à un AVK de première génération, la chlorophacinone, a permis d'établir une corrélation non linéaire entre les concentrations plasmatiques de cet AVK et son effet sur la cascade de coagulation, mesuré par le temps de Quick (TQ). Cependant, ces conclusions sont limitées par l'absence d'une vraie relation dose-réponse entre les concentrations retrouvées et l'augmentation du TQ, ainsi qu'en la nature de l'AVK testé, de première génération : les résultats sont difficilement généralisables aux AVK de seconde génération, puisque leur fraction circulante dans le plasma est moindre. La deuxième étude s'est basée sur une veille toxicologique réalisée sur une période de douze ans sur des rapaces retrouvés morts dans le quart sud-est de la France. Cette étude a visé à évaluer l'exposition secondaire de ces oiseaux aux AVK, et de tester la corrélation entre niveaux d'AVK retrouvés en *post-mortem* dans leur foie et probabilité d'intoxication, évaluée par la présence d'hémorragies à l'autopsie. Comme déjà observé dans de précédentes études sur le sujet, il s'est avéré que

l'établissement d'un seuil de toxicité, basé sur la sommation des résidus hépatiques d'AVK de seconde génération, était complexe. En effet, le critère de référence auxquels sont confrontés ces niveaux de contamination, i.e. la présence d'hémorragies, n'est pas spécifique. Par conséquent aucune corrélation significative n'a pu être démontrée, et une des conclusions majeures de cette étude est que l'établissement d'un seuil de concentration pour évaluer la toxicité des AVK n'est peut-être pas le marqueur d'effet le plus pertinent, ou du moins que le critère de référence choisi pour l'établir n'est sans doute pas le plus approprié.

Le dernier volet de notre travail a consisté en une exploration préliminaire d'un marqueur potentiel peu investigué jusqu'à présent, i.e. l'évolution des concentrations en deux vitamines de la vitamine K, la vitamine K1 et la ménaquinone-4 (MK4), dans des tissus facilement accessibles en *post-mortem* (foie, poumon et rein), suite à une exposition à une dose létale à un AVK, la bromadiolone. Les conclusions de cette étude pilote, réalisée à petite échelle dans des conditions contrôlées chez le rat, sont limitées et peu extrapolables, mais elles ouvrent des pistes de recherches intéressantes notamment concernant l'utilisation des ratios [forme oxydée]/[forme réduite] pour la vitamine K1 et la MK4, qui semblent augmenter dans un délai de 24h suite à une intoxication à un AVK. Ce ratio pourrait donc être un marqueur précoce de l'intoxication aux AVK.

Finalement, la question de départ de cette thèse n'a pas été pas réellement élucidée. Pourtant, ce travail apporte des éléments supplémentaires à la réflexion sur le sujet, et de manière plus globale sur la définition à apporter à la toxicité des AVK, relativement complexe. Il semblerait qu'un seul marqueur ne soit pas suffisant pour la caractériser, mais plutôt un ensemble de marqueurs. On pourrait également introduire un nouveau niveau de classification des marqueurs potentiels, en lien avec la nature de la toxicité des AVK investiguée, de deux grands types. Ainsi on pourrait distinguer :

- Les marqueurs de la toxicité aiguë des AVK, comme le tableau clinique, peu spécifique et peu sensible mais facilement observable, pouvant constituer un élément d'orientation du diagnostic en présence d'une intoxication sévère, ou encore l'exploration de la coagulation via la mesure des temps de coagulation, qui apparaît à l'heure actuelle comme le paramètre de référence le plus pertinent. Le dosage des facteurs de coagulation pourrait être une autre piste à explorer. L'établissement d'un seuil de toxicité pour les concentrations en AVK dans les tissus, et la relation dose-effet, restent à approfondir mais une réflexion supplémentaire est sans doute nécessaire pour choisir le comparateur le plus pertinent.
- Les marqueurs de la toxicité chronique ou sub-chronique des AVK : ceux-ci restent encore à définir, puisqu'il n'y a pas de consensus à l'heure actuelle sur les potentiels effets sub-létaux des AVK. Une

approche sans a priori (de type « omique ») pourrait peut-être permettre de définir de nouveaux biomarqueurs pertinents.

Ce travail ouvre donc d'autres questionnements et d'autres pistes de recherches futures sur le sujet.

I. INTRODUCTION GENERALE

L'usage ubiquitaire des pesticides est une problématique sociétale d'actualité. On observe une sensibilité accrue du public à l'impact de ces produits sur la santé humaine, sur la santé animale et sur l'environnement. Un suivi de l'exposition et des effets délétères potentiels est donc nécessaire, afin de mieux caractériser le risque inhérent à ces substances, et ainsi pouvoir informer au mieux les parties prenantes, que ce soit au niveau des décisionnaires concernant les autorisations de mise sur le marché ou à celui des utilisateurs, particuliers ou professionnels.

Parmi ces pesticides, les rodenticides anticoagulants sont des produits prépondérants dans la lutte chimique contre les rongeurs nuisibles, avec une utilisation de longue date, depuis les années 50 (Link, 1959; Schofield, 1984). Leur action sur le recyclage de la vitamine K entraîne des anomalies de la coagulation et une mort différée des suites d'hémorragies chez les individus contaminés. Plusieurs générations d'anti-vitamines K (AVK) ont été développées pour pallier à l'émergence de résistances chez les rongeurs (Goulois et al., 2017; Lefebvre et al., 2016a), les dernières générations représentant des molécules particulièrement persistantes et bioaccumulables dans les organismes (Giraudoux et al., 2006). Cela entraîne des problématiques de toxicité et d'écotoxicité de ces molécules, avec un risque majeur d'exposition des populations non-cibles. Cependant, il convient de distinguer exposition environnementale aux rodenticides, et intoxication réelle : ainsi, comment caractériser au mieux la toxicité des AVK ?

L'objectif majeur de ce travail est de tenter d'apporter des pistes de réponses à cette question, via un bilan critique et l'exploration sur le terrain de différents marqueurs de la toxicité et de l'écotoxicité des rodenticides anticoagulants chez la faune non-cible domestique et sauvage, dans le contexte d'une intoxication primaire chez des brebis laitières et d'expositions secondaires dans une population de rapaces. Il s'agit également d'apporter des pistes de développement d'un nouveau biomarqueur potentiel, la vitamine K et ses vitamères, en étudiant en laboratoire l'évolution de leurs concentrations dans les tissus chez des rats intoxiqués à la bromadiolone. Le but de ces études est une meilleure caractérisation de l'exposition de la faune non-cible aux AVK, et des effets de cette exposition chez les animaux intoxiqués, afin de contribuer à l'évaluation de la balance bénéfice/risque de ces substances.

II.CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1.Les rodenticides anticoagulants : usages et propriétés

Les rodenticides anticoagulants, aussi appelés anti-vitaminiques K (AVK), représentent un moyen de lutte chimique majeur contre les rongeurs nuisibles. Ces molécules agissent sur le recyclage de la vitamine K, cofacteur central de la coagulation sanguine, et sont ainsi responsables d'une mort différée des individus les ayant consommés, des suites d'hémorragies. Plusieurs générations d'AVK ont été développées, pour tenter de contrer les phénomènes de résistance observés chez les rongeurs, suite à leur utilisation massive.

II.1.1. Enjeux de la lutte contre les rongeurs nuisibles

Même si leur importance dans les chaînes trophiques ne peut être niée, la prolifération importante des populations de rongeurs, liée à leur capacité de reproduction rapide, nécessite d'être endiguée afin de limiter les dommages multiples qu'ils causent, à la fois économiques, écologiques et sanitaires (Witmer and Shiels, 2017).

On s'intéressera ici aux principales espèces de rongeurs considérées comme nuisibles, i.e. le rat brun *Rattus norvegicus*, le rat noir *Rattus rattus*, et la souris domestique *Mus musculus* (Quéré and Le Louarn, 2011). Il convient également de citer le campagnol terrestre *Arvicola amphibius* (anciennement *Arvicola terrestris*) qui entre également dans cette classification, à cause des dégâts causés sur les prairies dans les régions à vocation d'élevage (Delattre and Giraudoux, 2009).

II.1.1.1. Différents impacts des populations de rongeurs nuisibles

Les rongeurs peuvent être à l'origine de dommages de natures diverses, de par leur prolifération importante.

- Impact économique :

Les rongeurs peuvent causer des dommages de nature économique, par la dégradation de la ressource alimentaire et des infrastructures.

Les dommages sur la ressource alimentaire peuvent être directs, par la consommation des cultures céréalières avant récolte ou des réserves alimentaires stockées (Meerburg et al., 2009b), ou indirects, en rendant la nourriture impropre à la consommation via la contamination par les poils et les déjections. On estime qu'en moyenne 20% des récoltes mondiales sont détruites par les rongeurs et les insectes (Quéré and Le Louarn, 2011), et il est estimé que près de 280 millions d'individus souffrant de malnutrition pourraient bénéficier d'un meilleur contrôle des pertes pré- et post-récoltes associées aux rongeurs (Meerburg et al., 2009b).

Les rongeurs sont également responsables de dommages sur les infrastructures, par leurs activités de grugeage et de creusage. Ils rongent les matériaux, comme l'isolation des bâtiments, les câbles électriques, les tuyaux de gaz, ils déstabilisent les sols en creusant des galeries. Ces animaux peuvent ainsi être à l'origine de glissements de terrain, de coupures de courant, d'accidents de transports, de départ d'incendies etc...

Aux Etats-Unis, l'agence gouvernementale de protection de l'environnement (US-EPA) estimait en 2008 entre 0.5 et 1 milliard de dollars le coût annuel des dommages économiques totaux causés par les rongeurs, et à 8 millions celui des dégâts au niveau des infrastructures agricoles seules (United States Environmental Protection Agency, 2008).

- Impact écologique :

La prolifération des rongeurs dans des zones (notamment insulaires) où ils ont peu de prédateurs pourrait se faire au détriment d'autres espèces animales endémiques, particulièrement des oiseaux, mais également d'autres parties des écosystèmes comme les végétaux (graines) ou les invertébrés (Witmer and Shiels, 2017). Leur capacité de reproduction importante, leur régime omnivore et leur comportement de prédation assez agressifs font d'eux des éléments rapidement invasifs dans un écosystème où ils sont introduits, si aucune mesure de limitation n'est mise en place.

- Impact sanitaire :

Les rongeurs peuvent être vecteurs de nombreux pathogènes (bactéries, virus, parasites) zoonotiques, selon deux voies de transmission (Meerburg et al., 2009a) :

- Une transmission directe du rongeur à l'Homme, par morsure ou par consommation d'eau ou d'aliments contaminés par les fèces. L'Homme peut également se contaminer par contact avec les eaux de surface contaminées par l'urine de rongeur, ou par l'inhalation de germes présents dans les excréments (ex : hantaviroses).

- Une transmission indirecte, via le portage d'arthropodes vecteurs (tiques, puces, mites), ou suite à une ingestion accidentelle de rongeurs morts par du bétail, source de contamination des denrées produites à partir de ce bétail.

Meerburg et al. (2009) présente une revue assez exhaustive des pathogènes potentiellement transmis, parmi lequel l'agent bactérien bien connu de la peste bubonique *Yersinia pestis*, transmise par les puces de rats et à l'origine de pandémies dramatiques au cours de l'Histoire, et toujours présente dans certaines zones du globe comme Madagascar, ou les spirochètes du genre *Leptospira*, pour lesquels les rongeurs sont un réservoir majeur d'infection pour l'Homme, à travers la consommation d'eau ou d'aliments contaminés, ou par contact direct avec des eaux de surface. L'incidence de la leptospirose est en augmentation en France métropolitaine, de l'ordre de 1,05 cas pour 100 000 habitants en 2019, possiblement en lien avec une augmentation des populations de rongeurs, et elle est encore plus élevée en Outre-mer, de 12 à 70 fois selon le territoire considéré (données de Santé Publique France, <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-prevention-vaccinale/leptospirose/donnees/#tabs>, consulté le 29/09/2021). Cette maladie peut entraîner chez l'Homme des dysfonctionnements hépatiques et rénaux, des hémorragies pulmonaires, des uvéites ou encore des myocardites, et son taux de létalité est estimé entre 5 et 30% (World Health Organisation, 2011). Une lutte efficace contre son vecteur principal est donc nécessaire.

II.1.1.2. Un besoin de moyens de lutte efficaces

La lutte contre la prolifération des populations de rongeurs nuisibles peut prendre différentes formes : l'utilisation de dispositifs physiques comme les pièges ou les ultrasons (Buckle and Smith, 2015), la mise en place d'une lutte biologique soit par réduction du taux de natalité des rongeurs (ex : le produit CONTRAPEST[®] autorisé aux Etats-Unis et fabriqué par la société SenesTech, à base de 4-vinylcyclohexane) soit par augmentation de leur mortalité par inoculation de germes pathogènes (avec un risque de transmission à l'Homme) ou par prédation, notamment par des rapaces (Labuschagne et al., 2016).

Cependant c'est avant tout la lutte chimique qui reste prépondérante et relativement efficace dans ce domaine. On distingue dans cette catégorie, qui correspond à la classification TP14 – Rodenticides, deux grands types de produits :

- Les poisons à action rapide : en France, il s'agit essentiellement de l'alphachloralose utilisé dans les bâtiments pour la lutte contre les souris, mais on peut également lister le

cholécalférol, les produits de fumigation à base de cyanure d'hydrogène ou de phosphore d'aluminium, ou encore les cartouches de gaz à base de dioxyde de carbone à insérer dans un dispositif de piégeage (données publiques des biocides fournie par l'Agence Européenne des Produits Chimiques – ECHA : https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/biocidal-products__ - consultée le 25/08/2021). Ces produits représentent seulement 8% des produits biocides rodenticides autorisés en France. Leur utilisation reste limitée, notamment à cause du phénomène d'aversion alimentaire décrit chez les rongeurs, et également parce qu'ils peuvent présenter une toxicité aiguë non réversible (absence d'antidote spécifique ou fenêtre d'utilisation trop courte). A noter qu'un autre poison rapide, le phosphore de zinc, est autorisé en France comme produit phytosanitaire (base de données gouvernementale e-phy, <https://ephy.anses.fr/> - consultée le 25/08/2021).

- Les rodenticides anticoagulants, à action différée. Ces produits sont largement privilégiés dans la lutte chimique contre les rongeurs, et représentent ainsi 92% des produits biocides rodenticides autorisés en France. Ils sont au cœur de ce rapport.

II.1.2. Les rodenticides anticoagulants, des molécules prépondérantes dans la lutte chimique contre les rongeurs nuisibles

II.1.2.1. Une utilisation de longue date des AVK, des molécules pratiques d'utilisation

Les propriétés anticoagulantes des AVK ont été découvertes dans les années 20 en Amérique du Nord, suite à des épisodes de troubles hémorragiques spontanés chez des bovins liés à la consommation de mélilot (*Melilotus alba* ou *Melilotus officinalis*) ou de luzerne avariés (Link, 1959; Schofield, 1984). En effet, lors de la dégradation du mélilot, la coumarine contenue dans la plante est oxydée en 4-hydroxycoumarine qui, couplée au formaldéhyde et dimérisée, donne le dicoumarol, identifié comme un antagoniste de la vitamine K. Suite à cette découverte, de nombreux analogues du dicoumarol sont développés, dont la warfarine, utilisée d'abord en raticide dès 1948 puis en thérapeutique à partir de 1953.

Ainsi, depuis les années 50, les rodenticides anticoagulants sont largement utilisés dans la gestion des nuisibles, aussi bien en produits phytosanitaires sur les cultures qu'en biocides chez les

professionnels et les particuliers. Ces molécules présentent un grand intérêt dans la lutte contre les rongeurs pour plusieurs raisons :

- Un mode d'action différé qui permet de limiter le développement d'aversion chez les rongeurs traités. En effet, un comportement d'éviction alimentaire peut être observé notamment chez le rat, chez qui des animaux « testeurs » sont désignés face à toute nouvelle ressource alimentaire. Les autres membres du groupe ne consommeront pas la ressource si ces testeurs meurent suite à son ingestion (Mitchell et al., 1975).
- L'existence d'un antidote sûr et disponible, la vitamine K (Lefebvre et al., 2017) ;
- Une utilisation à des concentrations faibles.

Les rodenticides se présentent sur le marché sous diverses présentations contrôlées, revendiquant une appétence pour les rongeurs-cibles : céréales enrobés, granulés, blocs de paraffine etc., selon le site d'application et l'espèce ciblée (Suárez and Cueto, 2018). La mitigation du risque d'empoisonnement pour les espèces non-cibles est liée à la présence d'un agent amérisant additionnel, ainsi que par l'usage de stations de protection depuis 2013 pour limiter l'accès aux appâts et leur diffusion dans l'eau (Berny et al., 2014; Nakagawa et al., 2015; Suárez and Cueto, 2018). Cependant ces mesures restent insuffisantes pour prévenir l'exposition de la faune non-cible, comme il sera vu plus loin.

II.1.2.2. Plusieurs générations de molécules

On distingue pour les AVK trois structures chimiques de base : les dérivés de la 4-hydroxycoumarine (warfarine, coumachlore, coumatétralyl, bromadiolone, difénacoum, brodifacoum, flocoumafène), les dérivés du 4-hydroxy-benzothiopyranone (diféthialone), et les dérivés de l'indane-1,3-dione (chlorophacinone, diphacinone, pindone)(Lefebvre et al., 2017) (Figure 1). Ces molécules présentent une analogie structurale avec la vitamine K, dont ils sont antagonistes, et sont à l'origine de syndromes hémorragiques différés chez les rongeurs qui les consomment. Comme mentionné plus haut, cette action différée permet de limiter l'aversion des rongeurs pour les appâts, grâce à un délai suffisant pour que ceux-ci ne relient pas la mort de leurs congénères à la consommation des spécialités rodenticides (Parshad and Kochar, 1995).



Figure 1: Structure chimiques de base des AVKs. A : 4-hydroxycoumarine, B : 4-hydroxy-benzothiopyranone, C : indane-1,3-dione (extrait de Lefebvre et al. 2017)

Deux générations de rodenticides ont été développées :

- Les rodenticides de 1^{ère} génération : warfarine (aussi appelée coumafène), chlorophacinone, diphacinone et coumatétralyl. Toxiques par ingestion répétée, utilisés depuis les années 50, ils ont une faible persistance hépatique (Figure 2).

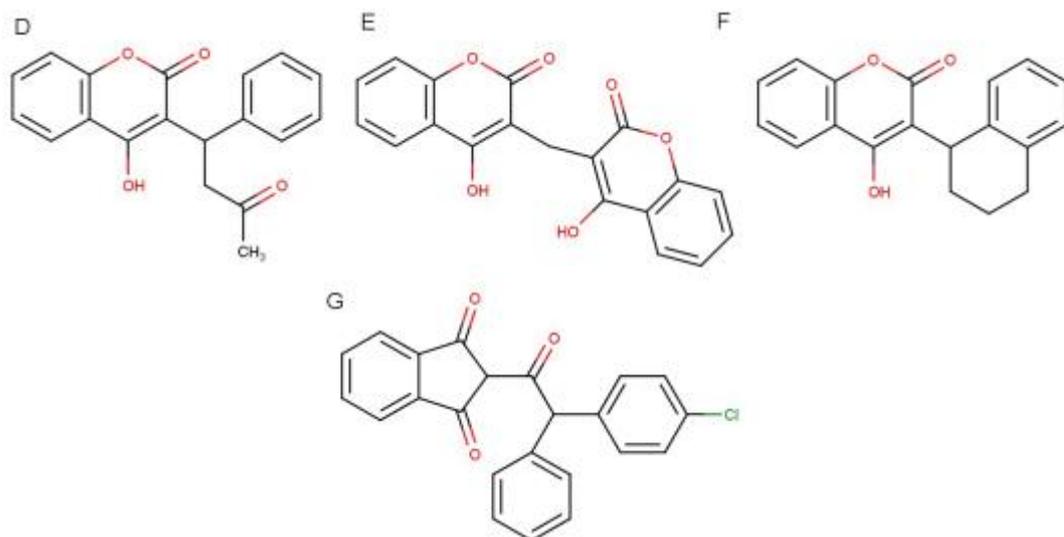


Figure 2: Structure chimique des rodenticides anticoagulants de première génération. D: warfarine; E : dicoumarol; F : coumatétralyl; G : chlorophacinone. (extrait de Lefebvre et al. 2017)

- Les rodenticides de 2^{ème} génération : bromadiolone, difénacoum, brodifacoum, diféthialone, flocoumafène. Cette seconde génération a été développée à partir de la fin des années 70 suite à l'émergence de résistance aux AVK de première génération (Lefebvre et al., 2016a; Goulois et al., 2017; Marquez et al., 2019). Ils sont plus efficaces, à des doses moindres. Toxiques par ingestion unique, ils ont une persistance hépatique beaucoup plus longue, de l'ordre de plusieurs semaines.

Ils diffèrent de la première génération de molécules par leur radical, qui inclut trois structures benzéniques, ce qui augmente la lipophilie de ces molécules et influe sur leurs propriétés pharmacocinétiques (Lefebvre et al., 2017).

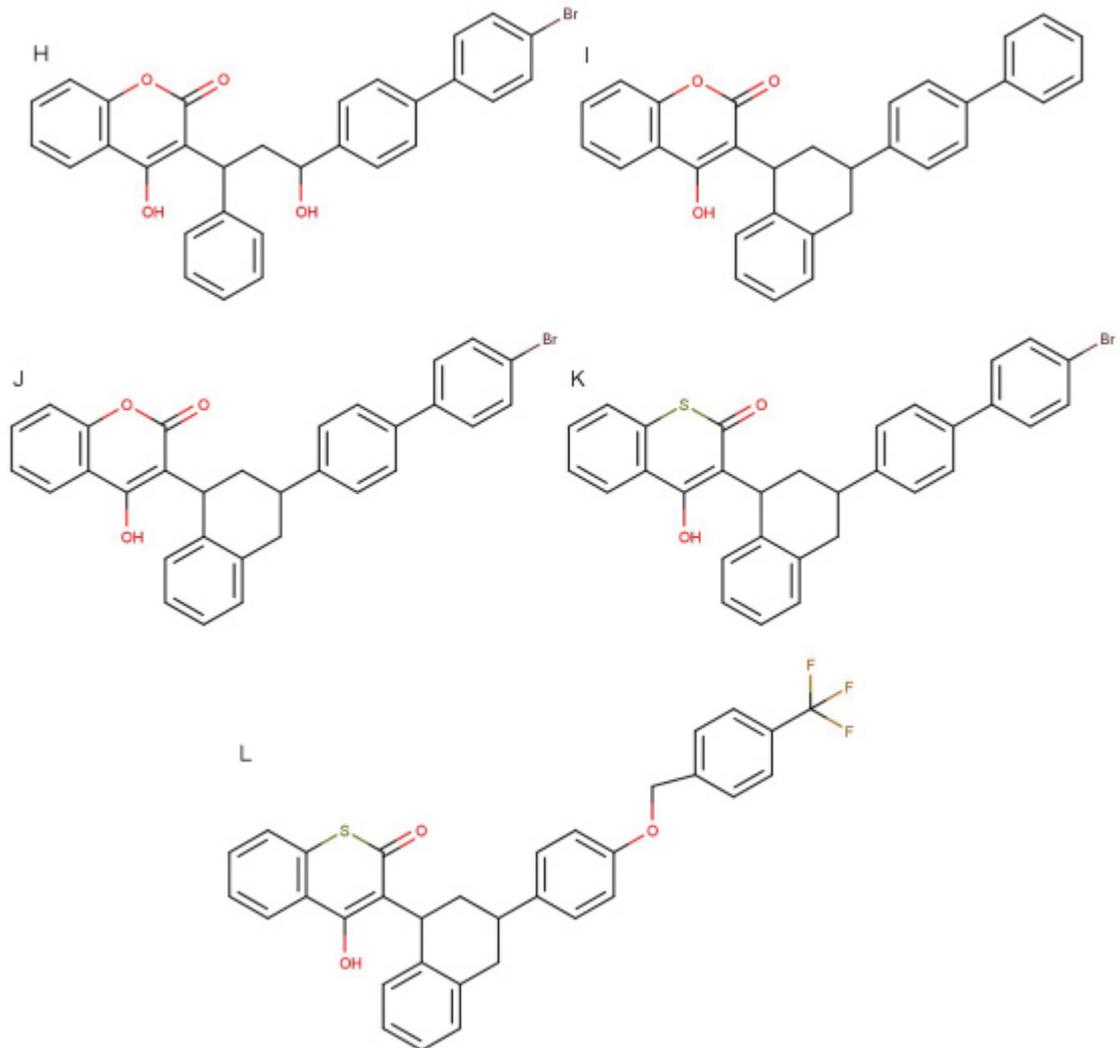


Figure 3 : Structure chimique des rodenticides anticoagulants de seconde génération. H : bromadiolone ; I : difénacoum ; J : brodifacoum ; K : diféthialone ; L : flocoumafène. (extrait de Lefebvre et al. 2017)

Ces molécules de seconde génération sont actuellement celles qui sont le plus utilisées dans la lutte contre les rongeurs.

II.1.2.3. Réglementation encadrant l'usage des AVK

On distingue de manière générale pour les pesticides en Europe deux grands types d'usage réglementés :

- Les produits phytopharmaceutiques (PPP), qui sont destinés à protéger les plantes contre les nuisibles (ex : fongicides, insecticides), influencer sur leur processus de développement (ex : promoteurs de croissance), les préserver (ex : conservateurs pour les fleurs coupées), détruire ou prévenir la pousse d'autres plantes indésirables (ex : herbicides). L'utilisation et la mise sur le marché de ces produits sont encadrées par le règlement européen n°1107/2009. La liste des produits utilisables comme PPP est disponible sur le site de la Commission européenne (https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en) ou, pour la France, via la base de données en ligne de l'Anses E-Phy (<https://ephy.anses.fr/>).
- Les produits biocides, destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes jugés nuisibles : champignons, bactéries, virus, rongeurs, insectes... Leur action peut être chimique ou biologique (ex : utilisation de microorganismes). Ils sont à usage domestique, professionnel ou industriels. Il en existe 22 types (TP) répartis en 4 groupes : les désinfectants, les produits de protection, les produits de lutte contre les nuisibles, et les autres produits biocides (définition de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Anses - <https://www.anses.fr/fr/content/l%27%C3%A9valuation-des-produits-biocides-comment-%C3%A7a-marche>). Ces produits sont encadrés par le règlement européen n°528/2012 (BPR, Biocidal Products Regulation). La liste des produits autorisés est consultable sur le site de l'Agence Européenne des produits chimiques (ECHA) (<https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/biocidal-products>) ou, pour le marché français, sur la base de donnée publique Simmbad (<https://simmbad.fr/public/servlet/accueilGrandPublic.html?>).

Les AVK rentrent dans le cadre de la réglementation sur les produits biocides. Il est à noter que ce règlement prévoit entre autres l'exclusion des substances actives classées en tant que substances cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR) de catégorie 1A ou 1B conformément au règlement (CE) 1272/2008 ou répondant aux critères pour être classées comme telles (Article 5 de la réglementation). Or les rodenticides de seconde génération sont classés CMR 1A ou 1B, sur la base de la reprotoxicité de la warfarine, même si des débats existent actuellement sur la pertinence de cette extrapolation, notamment considérant que les concentrations plasmatiques et fœtales des AVK de seconde génération sont très faibles (Chetot et al., 2020b). Les AVK remplissent également le critère d'exclusion concernant les substances qui répondent aux critères de désignation en tant que substances persistantes, bioaccumulables et toxiques (PBT) ou en

tant que substances très persistante et bioaccumulables (vPvB) selon l'annexe XIII du règlement (CE) no 1907/2006. Toutefois, le règlement prévoit la possibilité de dérogations pour l'approbation de telles substances actives au titre de raisons de santé publique et d'hygiène (article 19 (5)), ce qui est le cas pour les rodenticides anticoagulants.

Il n'existe à l'heure actuelle aucun produit rodenticide anticoagulant autorisé comme PPP en Europe. La réglementation française et européenne a en effet évolué au cours de ces 10 dernières années concernant les usages de ces molécules. Jusqu'en 2010, la chlorophacinone était autorisée pour un usage phytosanitaire dans le cadre du contrôle des populations de campagnol terrestre (*Arvicola terrestris*) (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2007). Plus récemment, en février 2020, la bromadiolone, qui était alors le seul PPP autorisé en France, a été retirée du marché par l'Anses), avec une obligation d'écouler les stocks dans un délai de 10 mois (https://www.anses.fr/fr/system/files/phyto/_decisions/_SUPERCAIDA_PREX_2015-1399_D.pdf). Le seul PPP autorisé actuellement en France dans la lutte contre les rongeurs est le phosphore de zinc (source : E-Phy – consulté le 25/08/2021).

II.1.2.4. Propriétés physico-chimique et pharmacocinétiques des rodenticides anticoagulants

Les rodenticides anticoagulants présentent une analogie structurale avec la vitamine K. Ils sont faiblement solubles dans l'eau, faiblement volatiles. Après ingestion, ils sont rapidement et efficacement absorbés (Watt et al., 2005), avec une biodisponibilité orale proche de 100%. Par ailleurs, certaines molécules peuvent traverser la barrière cutanéomuqueuse (Kataranovski et al., 2008; O'Reilly and Aggeler, 1968; Subota et al., 2015). Leur distribution dans l'organisme diffère selon la génération de la molécule considérée, car les rodenticides de seconde génération présentent une liposolubilité plus grande, et s'accumulent donc de manière plus importantes dans le foie par rapport à d'autres organes comme le rein, et ne circulent que de manière transitoire dans le plasma (Chetot et al., 2020a; Huckle et al., 1988; Rached et al., 2020). A l'inverse, même s'ils sont également présents dans le foie, les rodenticides de première génération circulent de manière plus importante dans le compartiment sanguin (Chetot et al., 2020a; Rached et al., 2020; Watt et al., 2005). Les AVK peuvent également s'accumuler dans les œufs ou le lait (Eadsforth et al., 1993).

L'élimination des AVK est principalement fécale (Enouri et al., 2015; Huckle et al., 1989; Kamil, 1987; Poché, 1988), et a lieu suite à leur métabolisation hépatique par les cytochromes P450 (CYP). Le Tableau 1, issu de la publication de Rached et al. (2020 – **article 1**) présente les demi-vies hépatiques

des différents AVK. Comme l'explique l'auteur principal de cet article, ces demi-vies sont à considérer avec prudence, car elles ont été mesurées avec une exposition à une faible dose, et avec un suivi de seulement quelques semaines alors que la valeur de la demi-vie pour certaines d'entre elles dépasse les 100 jours. De plus, certaines études rapportent des demi-vies de l'ordre de l'heure (Damin-Pernik et al., 2016). L'explication proposée par l'auteur tient en une cinétique d'élimination biphasique des AVK, avec la définition d'une demi-vie initiale correspondant à une décroissance rapide de la concentration en AVK, exprimée en heures, et d'une demi-vie terminale, rattachée à une deuxième phase de décroissance plus lente, de l'ordre de celles rapportées dans le tableau.

Tableau 1 : Demi-vies hépatiques des AVK chez le rat et la souris (extrait de Rached et al. 2020 – article 1). Pour les références desquelles ont été tirées les chiffres du tableau, se reporter à la publication.

Génération	Molécule	Demi-vie hépatique (jours)	
		Rat	Souris
1^{ère} génération	Chlorophacinone	35	35,4
	Diphacinone	3	-
	Coumatétralyl	55-62	15,8
	Warfarine	26,2-67	66,8
2^{ème} génération	Brodifacoum	113,5-350	307,4
	Bromadiolone	170-318	38,1
	Diféthialone	74-126	28,5
	Flocoumafène	215	93,8
	Difénacoum	118-128	61,8

Il est également à noter que la warfarine, ainsi que les AVK de seconde génération, sont des molécules chirales (avec systématiquement deux carbones asymétriques pour les AVK de seconde génération), et la voie d'élimination (isoformes de CYP450 impliqués) dépend donc à la fois de la molécule en elle-même mais également de sa chiralité. Ceci peut être un des mécanismes à l'origine des demi-vies différentes observées entre chaque stéréoisomère pour les AVK de seconde génération, avec certains stéréoisomères retrouvés longtemps après une exposition létale aux AVK, tandis que d'autres ne le sont pas (Damin-Pernik et al., 2017, 2016; Lefebvre et al., 2020). Ainsi, dans le cas de la diféthialone, les quatre stéréoisomères ont des demi-vies initiales respectives de 6,0 ; 25,4 ; 69,3 et 82,3 heures (Lefebvre et al., 2020). Ces différences pharmacocinétiques à l'échelle

stéréochimique ont une importance majeure dans la rémanence des AVK de seconde génération dans l'environnement, et dans l'exposition de la faune non-cible à ces molécules. Cet aspect sera développé plus loin.

II.1.3. La vitamine K, cible de l'action des rodenticides anticoagulants

Les AVK, comme leur nomenclature l'indique, sont des antagonistes de la vitamine K, un facteur majeur de la coagulation sanguine, également impliqué dans d'autres voies métaboliques. Nous nous intéresserons ici à caractériser la vitamine K, ses fonctions, et l'action des rodenticides anticoagulants vis-à-vis de ce facteur.

II.1.3.1. Caractéristiques des vitamines K

II.1.3.1.1. Plusieurs types de vitamine K

Il convient avant tout de préciser la terminologie utilisée. Il n'existe pas une seule vitamine K, mais bien des vitamines K : on distingue ainsi la phylloquinone, ou vitamine K1, d'origine végétale, les ménaquinones, MK, aussi appelées de manière assez raccourcie vitamine K2, d'origine bactérienne, et la ménadione (vitamine K3), synthétique ou produit de catabolisme (Booth and Suttie, 1998). Les vitamines K sont liposolubles, stables à la chaleur mais rapidement dégradées par lumière.

Ces dérivés lipidiques, de la famille des quinones, partagent un cycle commun 2-méthyl-1,4-naphtoquinone, qui correspond à la ménadione, avec adjonction à la position 3 du cycle d'une chaîne hydrophobe latérale plus ou moins saturée (Shearer and Newman, 2014) (Figure 4) :

- Une chaîne phytyle pour la vitamine K1, similaire à celle de la chlorophylle,
- Des unités prényl répétées pour les MKs (MK-n, le suffixe n correspondant au nombre d'unités prényl).

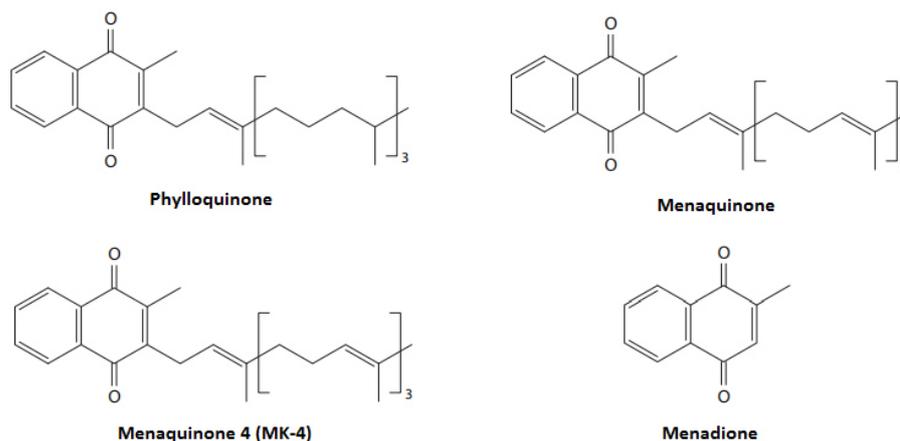


Figure 4 : structure des vitamères de la vitamine K

II.1.3.1.2. Origine des vitamines K : apports nutritionnels et biosynthèse

La phylloquinone est synthétisée par les plantes et les cyanobactéries. Elle est la forme principale de vitamine K dans les régimes alimentaires occidentaux (Bolton-Smith et al., 2000), et est essentiellement retrouvée dans légumes verts (Booth, 2012). Les ménaquinones sont quant à elles synthétisées par des bactéries anaérobies, dont certaines appartenant à la microflore intestinale humaine (Fernandez and Collins, 1987), essentiellement au niveau du gros intestin, et se retrouvent dans les foies animaux et les aliments fermentés comme le fromage. La biodisponibilité de la vitamine K1 et de ménaquinones issues de l'alimentation semble variable : ainsi, en général, les formes de vitamine K liées aux membranes (vitamine K1 dans les plantes, MKs dans les bactéries) sont peu biodisponibles, tandis que les vitamines K contenus dans les aliments huileux ou transformés sont mieux absorbées (Shearer et al., 2012).

Une des ménaquinones qui semble avoir un rôle physiologique important mais encore pas totalement élucidé (Shearer and Newman, 2014), et qui constitue la forme majoritaire de la vitamine K dans l'organisme, est la MK-4, utilisée chez l'Homme, principalement au Japon, en médicament (traitement de l'ostéoporose) ou en supplémentation dans l'alimentation des nourrissons (prévention des saignements liés à un déficit de vitamine K) (Ronden et al., 1998b; Shearer and Newman, 2014). La MK-4 n'est pas majoritairement synthétisée par des bactéries comme les autres ménaquinones, mais peut être synthétisée par l'organisme à partir de précurseurs, i.e. la vitamine K1 alimentaire ou encore la vitamine K3, par une enzyme caractérisée chez l'Homme sous le nom d'UBIAD1 (Nakagawa et al., 2010). Cette enzyme, localisée dans le réticulum endoplasmique, est l'analogue humain de l'enzyme bactérienne d'*Escherichia coli* MenA, impliquée dans la biosynthèse de MK-4. Des zones d'ombre demeurent encore sur l'interconversion entre vitamine K1, MK-4 et vitamine K3 : en effet UBIAD1 possède une activité forte de prénylation de la ménadione, mais une

activité plus faible de clivage de la chaîne phytyle. Il semblerait qu'une faible proportion de la phylloquinone alimentaire soit convertie en ménadione dans l'intestin, non pas par la flore intestinale mais possiblement au niveau des entérocytes (Hirota et al., 2013; Ronden et al., 1998a), puis transportée par la lymphe et la circulation sanguine jusqu'aux tissus où elle subit une réduction en hydroquinone, puis une prénylation par UBIAD1 pour former MK-4 (Hirota et al., 2013). L'activité d'UBIAD1 n'est pas sensible à la warfarine (Nakagawa et al., 2010).

II.1.3.1.3. Absorption, distribution et élimination des vitamines K

L'absorption de la vitamine K alimentaire au niveau intestinale est commune à celle des autres vitamines lipophiles, avec un passage via les entérocytes, un assemblage en chylomicrons, une sécrétion lymphatique et un passage sanguin via le canal thoracique (Shearer and Newman, 2014). Sa distribution dans l'organisme varie elle selon les vitamines étudiées. Ainsi la vitamine K1 se retrouve majoritairement dans le foie et le cœur, avec une capacité de stockage très importante, tandis que MK-4 s'accumule elle préférentiellement dans les tissus extra-hépatiques, notamment le pancréas, le cerveau, les reins et les testicules (Ronden et al., 1998b).

Il est à noter que les réserves de vitamine K (K1 et MK-4) sont faibles dans les tissus, de même que les concentrations plasmatiques, par rapport à d'autres vitamines liposolubles. En effet les vitamines K sont intensivement métabolisées par le foie, avec une excrétion majoritairement dans la bile sous forme de glucuronides. Il a ainsi été estimé que 60 à 70 % des quantités de vitamine K1 absorbées à chaque repas y sont excrétées (Shearer and Newman, 2014).

L'absorption de la vitamine K3 est moins documentée : des sels hydrosolubles de ménadione ont été introduits au début des années 40 chez l'Homme, pour la prophylaxie chez les nouveaux-nés, mais leur usage a été rapidement supplanté par celui de la vitamine K1. Chez les animaux, il semblerait que la ménadione soit principalement absorbée via la veine porte, ne s'accumule pas spécifiquement dans certains organes, et est fortement excrétée sous forme inchangée dans l'urine. Seule une faible fraction de la vitamine K3 est convertie dans les tissus en ménaquinone-4 (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2000).

II.1.3.2. Un rôle majeur dans l'hémostase secondaire

II.1.3.2.1. *Physiologie de l'hémostase*

La vitamine K est un cofacteur majeur de la seconde phase de l'hémostase, qui en comporte trois, interdépendantes (Heemskerk et al., 2002; Kumar et al., 2010; Lasne et al., 2006; Palta et al., 2014) :

- L'hémostase primaire, responsable de la formation du « clou plaquettaire » au niveau de la lésion endothéliale, suite au contact entre le sang et le collagène sous-endothélial pro-agrégant et pro-coagulant. Cette phase résulte d'interactions complexes entre les thrombocytes, la paroi vasculaire et des protéines d'adhésion. Elle comprend un temps vasculaire (vasoconstriction neurohumorale réflexe) et un temps plaquettaire, qui aboutit à la formation du clou plaquettaire qui comble la brèche vasculaire, mais ne peut à lui seul stopper l'hémorragie s'il n'est pas renforcé.
- L'hémostase secondaire, qui permet de consolider le thrombus formé lors de la 1ère phase en générant un caillot de fibrine insoluble. Cette étape, initiée simultanément avec l'hémostase primaire suite au contact entre le sang et la matrice extra-cellulaire sous-endothéliale, fait intervenir des facteurs de coagulation au nombre de 12 (numérotés de I à XIII – pas de facteur VI), principalement synthétisés par le foie : ces facteurs nécessitent d'être activés pour remplir leur rôle physiologique (Tableau 2). L'activation en cascade de ces facteurs aboutit à la formation de thrombine, qui est l'enzyme responsable de la polymérisation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble, constituant principal du caillot sanguin.
- La fibrinolyse, qui permet de détruire le caillot sanguin une fois la lésion endothéliale réparée. Elle fait intervenir une enzyme protéolytique, la plasmine (issue de l'activation du plasminogène plasmatique), qui agit sur le fibrinogène et la fibrine pour produire des produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène, les PDF.

Ces phénomènes sont finement régulés pour assurer la fluidité du sang dans l'appareil circulatoire et éviter les effusions sanguines dès qu'il y a lésion vasculaire.

Tableau 2 : les facteurs de coagulation

Facteur	Nom usuel	Lieu de synthèse	Fonction	Dépendance à la vitamine K
I	Fibrinogène	Hépatocyte	Substrat de la thrombine	
II	Prothrombine	Hépatocyte	Enzyme	+
III	Thromboplastine tissulaire	Nombreux tissus	Enzyme	
IV	Calcium		Cofacteur	
V	Proaccélélerine	Hépatocytes Endothélium	Cofacteur	
VII	Proconvertine	Hépatocyte	Enzyme	+
VIIIc	Facteur anti-hémophilique A	Endothélium Macrophages	Cofacteur	
IX	Facteur anti-hémophilique B	Hépatocytes	Enzyme	+
X	Facteur Stuart	Hépatocytes	Enzyme	+
XI	Facteur Rosenthal/antécédent de la thromboplastine plasmatique	?	Enzyme	
XII	Facteur Hageman	?	Enzyme	
XIII	Facteur stabilisant de la fibrine	Hépatocytes Mégacaryocytes	Enzyme	

II.1.3.2.2. L'hémostase secondaire, « temps plasmatique » de l'hémostase

L'hémostase secondaire, ou « coagulation plasmatique » correspond à la formation du caillot sanguin, formé par des cellules sanguines maintenues entre elles par la fibrine, protéine insoluble provenant de la polymérisation du fibrinogène, et intervient en complément du clou plaquettaire formé au cours de la première phase de l'hémostase (Heemskerk et al., 2002; Kumar et al., 2010; Lasne et al., 2006; Palta et al., 2014). Il s'agit d'une cascade de réactions enzymatiques faisant intervenir des facteurs de coagulation (FC) numérotés de I à XIII (pas de facteur VI), et présents dans le plasma (sauf le facteur III) (Tableau 2). Chaque facteur est désigné par un chiffre romain, accompagné de la lettre « a » s'il est activé. A noter que le facteur III (facteur tissulaire) n'a pas besoin d'être activé pour jouer son rôle dans la coagulation : il s'agit d'une lipoprotéine cellulaire exposée lors de lésion vasculaire. Les facteurs II, VII, IX, X, XI, XII sont des proenzymes synthétisées par le foie. Le facteur I (fibrinogène) représente le substrat final de la réaction. Les facteurs V et VIII sont des cofacteurs.

La coagulation est restreinte aux sites où l'assemblage entre membranes phospholipidiques, calcium (Ca) et complexe formé par le facteur de coagulation activé, son substrat (proenzyme d'un FC) et un cofacteur (potentialisateur de la réaction) est possible. Cela correspond à la surface des plaquettes activées exprimant le facteur plaquettaire 3, ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales activées.

On distingue deux voies d'activation de la coagulation, qui sont interdépendantes *in vivo* et initiées simultanément (Figure 5) :

- La voie endogène ou intrinsèque : il s'agit de la voie du facteur Hageman (facteur XII), qui ne fait intervenir que les facteurs plasmatiques. Elle se déclenche soit suite à l'activation du facteur XII au contact avec les structures du sous-endothélium chargées négativement (collagène) en présence de kininogène de haut poids moléculaire et de kalllicréine (« système contact », essentiellement observé *in vitro*), soit suite à l'activation du facteur IX via la voie exogène (voie majeure *in vivo*). L'activation du facteur XII conduit à la libération du fragment protéique PKA (Prekallikrein Activator) activant la prékalllicréine plasmatique en kalllicréine, et responsable de l'auto-amplification massive de l'activation du facteur XII. On a ensuite en cascade l'activation du FC XI en FC XIa, qui conduit à l'activation du FC IX en IXa, pour former un complexe correspondant à la thromboplastine endogène, et comprenant le FC IXa, le FC VIIIa, du calcium (Ca^{2+}), et des phospholipides membranaires (facteur plaquettaire 3, FP3). Ce complexe permet l'activation du FC X en Xa.

- La voie exogène ou extrinsèque : elle fait intervenir les facteurs tissulaires, et débute suite à la libération du facteur tissulaire (FT - facteur III), lipoprotéine membranaire, secondairement à la lésion vasculaire. Le FC III permet d'activer le FC VII, et il y a formation d'un complexe FT-FC VIIa-Ca²⁺ (thromboplastine exogène) qui permet l'activation du FC X en Xa. Ce complexe rend également possible l'activation du FC IX en IXa, permettant la mise en jeu de la voie intrinsèque.

L'activation du facteur X (facteur de Stuart) soit par la thromboplastine exogène (III/VIIa/Ca²⁺), soit par la thromboplastine endogène (IXa/VIIIa/Ca²⁺/FP3) amorce la voie commune de la coagulation. Le complexe prothrombinase (Xa/Va/Ca²⁺/FP3) se forme pour permettre l'activation de la prothrombine (II) en thrombine (IIa). La thrombine (IIa) va elle permettre la polymérisation du fibrinogène en fibrine, stabilisée par le facteur XIIIa.

La thrombine possède des propriétés d'auto-amplification de l'hémostase. Ainsi, à faible concentration, elle active les cofacteurs V et VIII, mais inhibe à forte concentration ces mêmes cofacteurs, ainsi que le complexe prothrombinase. Elle permet également l'activation des FC VII et IX, ainsi que celle du facteur stabilisant XIII. Elle favorise enfin l'activation plaquettaire, et notamment l'exposition à la surface des plaquettes activées des phospholipides anioniques qui fixent les facteurs de coagulation (FP3).

L'hémostase secondaire est un phénomène régulé, avant tout par la localisation du phénomène uniquement à la surface du thrombus plaquettaire. De plus d'autres facteurs anti-coagulants peuvent intervenir, comme l'antithrombine qui inhibe la thrombine (IIa), le facteur de Stuart (Xa) ainsi que les FC de la voie intrinsèque (IXa, XIa, XIIa), ou encore le système plasmatique de la protéine C (complexe entre protéine C, thrombomoduline, protéine S et phospholipides) qui inactive les FC Va et VIIIa. La protéine Z intervient également dans cette régulation, et est présentée comme un cofacteur de la ZPI, une protéase qui inhibe le FC Xa (Figure 5). On peut aussi citer les inhibiteurs de la voie tissulaire (Tissue Factor Pathway Inhibitors) qui neutralisent le complexe facteur tissulaire III/FC VIIa, ainsi que les PDF qui ont une action anti-agrégante plaquettaire, inhibitrice de la fibrinoformation et inhibitrice de la thrombine (IIa) et des cofacteurs Va et VIIIa.

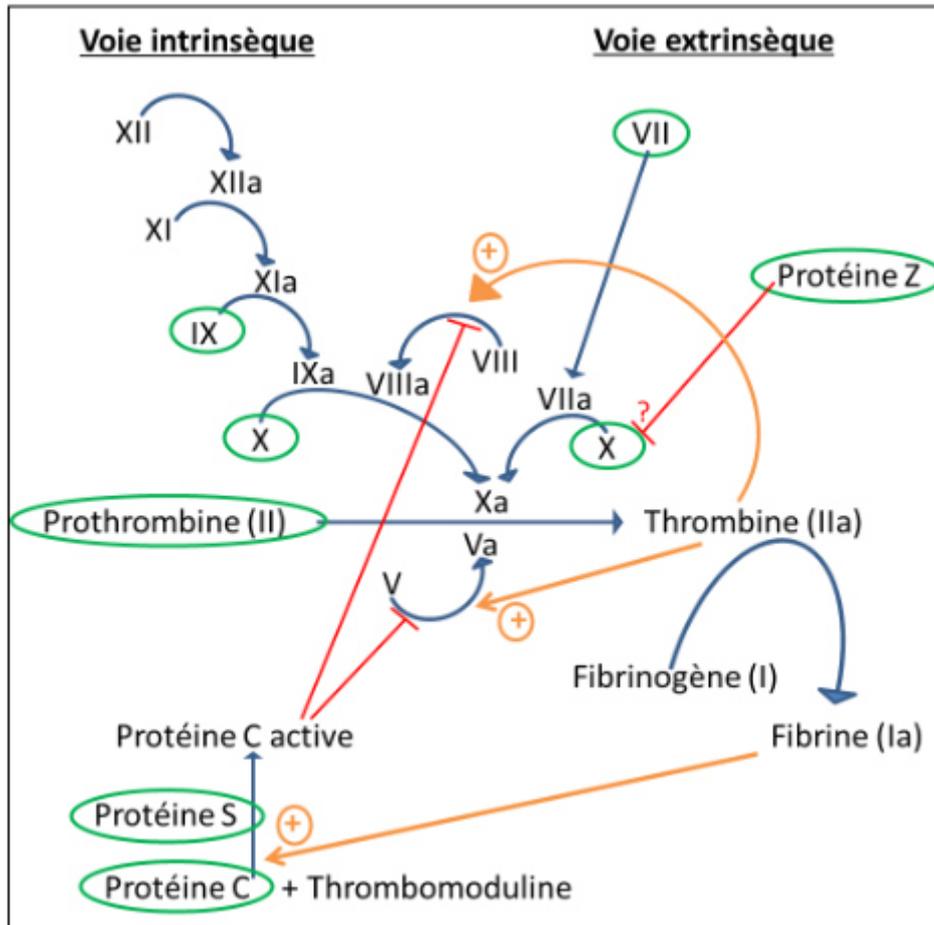


Figure 5 : Les voies de la coagulation (tirée de Hammed 2013)

(Les voies stimulatrices de la coagulation sont figurées en bleu, les voies inhibitrices en rouge et les voies de rétrocontrôle par la thrombine en orange. Les PVKDs intervenant dans cette cascade de coagulation sont entourées en vert.)

II.1.3.2.3. L'hémostase secondaire, un temps dépendant de la vitamine K

Parmi les facteurs de la cascade de coagulation, les facteurs II, VII, IX et X, synthétisés par le foie, portent des résidus glutamate qui nécessitent une gamma-carboxylation post-traductionnelle pour pouvoir chélater le calcium (Ca^{2+}) et se fixer ensuite aux phospholipides des membranes plaquettaires, exposés suite à l'inversion de ces membranes pendant l'hémostase primaire (système faisant intervenir des flippases), pour réaliser la réaction de coagulation. Cette gamma-carboxylation est une réaction de substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxyle (COO^-) sur le carbone γ d'un acide glutamique (Glu), ainsi transformé en acide γ -carboxylglutamique (Gla) (Esmon et al., 1975; Furie et al., 1999). Elle est réalisée par une gamma-glutamyl-carboxylase (GGCX), une enzyme membranaire située dans le réticulum endoplasmique rugueux, et nécessite plusieurs

cofacteurs, parmi lesquels la vitamine K, sous sa forme réduite (hydroquinone) (Figure 6). On qualifie donc ces facteurs de coagulation de facteurs « vitamine-K dépendants » (PVKD) (Danziger, 2008).

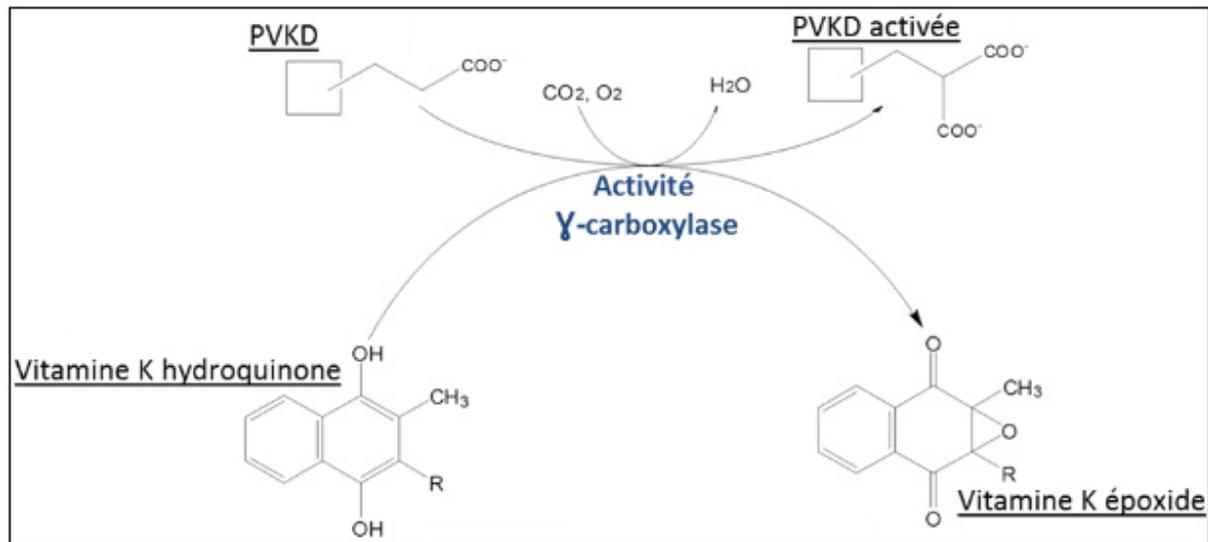


Figure 6: La réaction de gamma-carboxylation (tirée de Hammed 2013)

Certaines protéines anti-coagulantes intervenant dans la cascade sont également des PVKD : la protéine C, la protéine S, ainsi que la protéine Z.

Ainsi la vitamine K joue un rôle central dans l'hémostase secondaire, en permettant l'activation des facteurs PVKD. Il existe cependant d'autres protéines vitamine-K dépendantes dans l'organisme.

II.1.3.3. D'autres rôles physiologiques associés à des protéines vitamine-K dépendantes (PVKD)

Comme vu ci-dessus, on dénombre 7 PVKD hépatiques, qui jouent un rôle dans la cascade de coagulation (4 facteurs de coagulation et 3 protéines anticoagulantes). Cependant, d'autres protéines à localisation extra-hépatiques ont été identifiées par la suite, qui dénotent divers rôles physiologiques de la vitamine K au-delà de son implication dans l'hémostase (Tableau 3).

Tableau 3: Les PVKD et leurs fonctions (adapté de Ferland 2012)

Protéines	Fonction physiologique
Coagulation sanguine	
Prothrombine (II)	Pro-coagulant
Facteur VII	Pro-coagulant
Facteur IX	Pro-coagulant
Facteur X	Pro-coagulant
Protéine C	Anticoagulant
Protéine S	Anticoagulant
Protéine Z	Anticoagulant
Os	
Ostéocalcine	Régulation négative de la formation osseuse Régulation du métabolisme énergétique (<i>sous forme sous-carboxylée</i>) : synthèse et sensibilité à l'insuline (Hill et al., 2014; Hwang et al., 2009)
Protéine matricielle Gla (MGP)	Inhibiteur de la calcification (également dans les tissus mous) → principal inhibiteur de la calcification vasculaire (Zebboudj et al., 2003)
Autres	
Gas6	Différenciation cellulaire, prolifération, adhésion et chimiotaxie ; phagocytose et protection contre l'apoptose
Protéines transmembranaires Gla (TMGs)	Indéterminée
GRP (Gla-Rich Protein)	Régulation du calcium extracellulaire ? Stabilisation/organisation de la matrice du cartilage ? (Cancela et al., 2012)
Transthyrétine	Ligand pour les hormones thyroïdiennes Protéine de liaison du rétinol

Il est à noter qu'au-delà de son rôle dans la coagulation, la protéine S, qui a une structure sensiblement similaire à la protéine Gas 6, est également synthétisée dans d'autres tissus que le foie comme le cerveau, les muscles vasculaires lisses, les ostéoblastes etc... Elle est impliquée dans la régulation de l'inflammation (voie d'activation du complément) mais présente également des propriétés neuroprotectrices lors d'ischémie, et pourrait également jouer un rôle dans le métabolisme osseux (Berkner and Runge, 2004).

II.1.3.3.1. L'ostéocalcine, une PVKD osseuse

L'ostéocalcine (ou BGP, pour Bone Gla Protein) est une protéine non collagénique de l'os, produite uniquement par les ostéoblastes, qui comporte 3 résidus Glu. Suite à la gamma-carboxylation de ces résidus, la protéine présente une affinité marquée pour le calcium et l'hydroxyapatite, lui conférant son rôle d'inhibiteur de la minéralisation osseuse. Cependant, des études récentes suggèrent un rôle plus large de l'ostéocalcine, qui s'étend à la régulation du métabolisme, de la reproduction et de la cognition (Zoch et al., 2016). Ainsi, l'ostéocalcine non gamma-carboxylée agirait au niveau du pancréas sur les cellules β des îlots de Langerhans, en augmentant leur prolifération et ainsi la production et la sécrétion d'insuline (Hill et al., 2014; Hwang et al., 2009). Elle aurait également une action au niveau du cerveau (augmentation de la production de neurotransmetteurs), dans les testicules (stimulation de la production de testostérone), ou encore sur le muscle et les tissus adipeux (augmentation de la sensibilité à l'insuline).

II.1.3.3.2. La MGP et la GRP, des PVKD intervenant dans les phénomènes de calcification

Initialement isolée dans la matrice osseuse au niveau du cartilage (Price et al., 1983), la MGP (Matrix Gla Protein) se retrouve également dans d'autres tissus comme les poumons, le cœur et les reins (Fraser and Price, 1988), ainsi que dans les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, remettant ainsi un peu en question la classification proposée par Ferland (Tableau 3). Cette petite protéine sécrétoire, une fois libérée dans l'espace extra-cellulaire, agit comme un inhibiteur local de la calcification, et joue ainsi un rôle majeur dans la régulation de la calcification vasculaire. Cependant, la MGP activée pourrait également jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité microvasculaire et dans la préservation de la structure et des fonctions de certains organes comme la rétine, le rein et le cœur (Wei et al., 2019). De plus, la MGP plasmatique sous-carboxylée et

déphosphorylée est considérée chez l'Homme comme un biomarqueur d'un déficit en vitamine K (Dalmeijer et al., 2012).

La GRP (Gla-Rich Protein) est, elle, une PVKD circulante découverte plus récemment, dans les années 2000. Comme la MGP, elle intervient comme inhibiteur de la calcification dans les tissus cardiovasculaires et articulaires (Viegas et al., 2015), mais agirait également comme un agent anti-inflammatoire au niveau des chondrocytes et des synoviocytes lors des phénomènes d'arthrose (Cavaco et al., 2016). Des investigations sont menées concernant son utilisation comme marqueur de la calcification vasculaire et de la dysfonction rénale chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (Silva et al., 2020).

Ainsi la vitamine K est un cofacteur important dans la cascade de coagulation, mais également dans d'autres voies métaboliques. Les AVK agissent sur ce cofacteur, en inhibant son recyclage.

II.1.3.4. Inhibition du recyclage de la vitamine K par les rodenticides anticoagulants

Un des produits de la réaction de gamma-carboxylation décrite plus haut est la vitamine K sous forme époxyde. Un système de recyclage de cette forme oxydée permet une réutilisation du cofacteur dont les réserves sont limitées dans l'organisme, et les apports alimentaires insuffisants pour couvrir les besoins journaliers, de l'ordre de 200 à 500 fois (Lefebvre et al., 2016b). Ce recyclage se déroule en deux étapes (Figure 7) :

- Une réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone, catalysée par la Vitamine K Epoxyde Reductase (VKORC1), une enzyme membranaire du réticulum endoplasmique ;
- Une seconde réduction de la vitamine K quinone en vitamine K hydroquinone, principalement catalysée par VKORC1, mais également de manière plus minoritaire par une voie alternative médiée par la NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) (Gong et al., 2008; Ingram et al., 2013; Tie and Stafford, 2016).

Les rodenticides anti-coagulants sont des inhibiteurs non compétitifs de l'enzyme VKORC1 : ils bloquent ainsi le recyclage de la vitamine K, et donc la gamma-carboxylation des facteurs vitamine-K dépendants. Ils inhibent donc de façon indirecte la cascade de coagulation, en induisant un

l'absence, ou du moins la rareté, de réactions indésirables qui seraient liées à une déficience en d'autres PVKD, telles que les calcifications artérielles, suite aux traitements anticoagulants (Hammed et al., 2013).

II.1.4. Différences de sensibilité et résistance aux rodenticides anticoagulants

L'usage massif des rodenticides anticoagulants dans le contrôle des nuisibles a conduit à la sélection de rongeurs résistants. Cette résistance a été documentée pour la première génération de rodenticides à partir des années 60 (Boyle, 1960), d'abord en Angleterre puis à l'échelle mondiale (Goulois et al., 2017; Grandemange et al., 2010). L'émergence de résistance a également été plus récemment documentée pour les rodenticides de seconde génération (Mooney et al., 2018; Quy et al., 1995). Récemment, McGee et al ont publié une revue des mécanismes de résistance aux rodenticides chez les rongeurs (McGee et al., 2020). On ne citera ici que les principaux, et plus communément admis.

Selon Greaves, la résistance aux rodenticides anticoagulants se caractérise par une perte majeure d'efficacité dans des conditions adéquates d'utilisation de l'anticoagulant, la perte d'efficacité étant liée à l'existence d'une souche de rongeurs possédant une sensibilité considérablement réduite à cet anticoagulant, transmissible de manière héréditaire (Greaves, 1994). Cependant, au-delà de ces phénomènes de résistance entrant dans la définition de Greaves, des différences de sensibilité aux AVK existent également selon l'espèce (Rattner and Harvey, 2021), le sexe (Lefebvre et al., 2016b) ou encore la génétique de l'individu concerné.

II.1.4.1. Une résistance de cible aux rodenticides anticoagulants

Un support génétique de la résistance a été documenté chez le rat brun *Rattus norvegicus* (Grandemange et al., 2010; Hodroge et al., 2011; Pelz et al., 2005; Rost et al., 2009), le rat noir *Rattus rattus* (Cowan et al., 2017; Takeda et al., 2018; Tanaka et al., 2012) et la souris domestique *Mus musculus* (Goulois et al., 2017), en lien avec des mutations (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) du gène *vkorc1* affectant la séquence de l'enzyme responsable du recyclage de la vitamine K. Ainsi, 25 mutations différentes ont été décrites chez le rat brun (Rost et al., 2009), même si seul un petit nombre d'entre elles sont associées à un phénotype de résistance majeure : ainsi les 5 principales mutations en Europe sont L120Q, L128Q, Y139C, Y139F et Y139S, chacune avec des aires de répartition différentes (Pelz et al., 2005). La fréquence des mutations est également très importante

chez la souris (Goulois et al., 2017), tandis qu'elle semble plus rare chez le rat noir (Goulois et al., 2016). A cause de la similarité de structures entre les AVK, cette résistance est souvent croisée et affecte généralement tous les rodenticides de première génération, voire quelques fois ceux de seconde génération.

De la même manière, les différences de sensibilité aux AVKs pourraient également être en grande partie expliquées par une différence dans la séquence de VKORC1 entre les espèces (Figure 8) : même si le site actif de l'enzyme est bien conservé entre les espèces, de nombreux changements existent sur les autres parties de la protéine, et comme dans le cas de la résistance documentée chez les rongeurs, une variation au niveau d'un seul acide aminé peut induire une sensibilité plus ou moins importante à l'action des rodenticides. Cela dépend cependant de la mutation en question, et pour de nombreuses espèces l'impact du polymorphisme de VKORC1 sur la sensibilité aux AVK est inconnu (Hodroge et al., 2011).

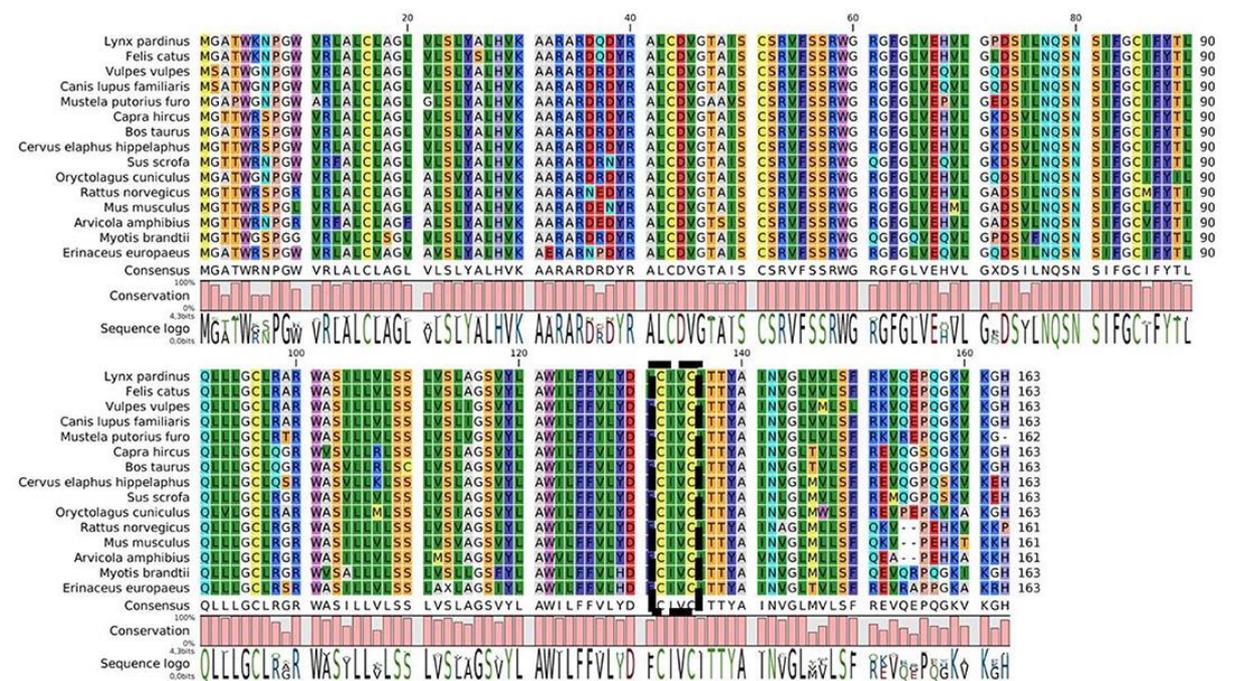


Figure 8: Alignement de séquences de l'enzyme VKORC1 de 15 espèces pouvant potentiellement être la cible des AVK. Le site actif de l'enzyme est encadré. (Extrait de Rached et al. 2020 - article 1)

Le ratio d'expression entre VKORC1 et VKORC1L1, moins sensible à l'action des AVK (Hammed et al., 2013), pourrait également être une piste pour expliquer les différences de sensibilité entre espèces.

II.1.4.2. Des différences métaboliques également à l'origine de résistances

Un autre mécanisme supposé de la résistance des rongeurs aux AVKs se situe au niveau de la pharmacocinétique, avec des différences dans leur métabolisation via le cytochrome P450. Ainsi une surexpression de certains isoformes du cytochrome, comme le CYP 3A2 (décrit dans le cadre de la résistance à la warfarine chez le rat noir), conduirait à une augmentation du métabolisme des AVK (Boitet et al., 2018; Ishizuka et al., 2007; Sugano et al., 2001).

De la même manière, le taux d'élimination des AVK varie selon les espèces et les AVK considérés. Ainsi, comme vu précédemment (paragraphe II.1.1.4), les demi-vies hépatiques des rodenticides varient entre rats et souris. De même, certaines espèces d'oiseaux comme la poule domestique *Gallus domesticus* montrent une activité métabolique de la warfarine plus grande que chez le rat, tandis que chez d'autres, comme certains hiboux, une métabolisation très réduite de cette molécule a été observée (Watanabe et al., 2010). Les différences au niveau du métabolisme pourraient également expliquer en partie les différences de sensibilité aux AVK entre mâles et femelles, l'expression des cytochromes P450 étant dépendante du sexe (Horak et al., 2020; Markussen et al., 2008).

II.1.4.3. D'autres mécanismes impliqués dans la résistance et les différences de sensibilité observées ?

Il a été démontré que l'importance des réserves en facteurs de coagulation était un des mécanismes intervenant dans la différence de sensibilité aux AVK entre rats mâles et femelles (Lefebvre et al., 2016b). Ainsi, chez le rat les femelles disposent d'un taux basal de facteur VII plus élevé que chez les mâles, et la diminution des facteurs II et X est plus lente, et la coagulation est donc moins rapidement impactée chez la femelle que chez le mâle. Cependant, cette différence de sensibilité varie selon les espèces.

Un autre facteur de résistance pourrait être lié à l'alimentation. Ainsi, chez le campagnol terrestre *Arvicola terrestris*, soumis à une pression conséquente des traitements AVK dans certaines régions (Delattre and Giraudoux, 2009; Giraudoux et al., 2006), des manques d'efficacité des traitements en place ont été rapportés, sans qu'un support génétique de la résistance aux traitements ne soit démontré. Une étude récente a montré qu'une résistance saisonnière liée à l'alimentation riche en vitamine K1 pourrait en partie expliquer ces manques d'efficacité des traitements (Abi Khalil et al., 2021).

Ainsi les rodenticides anticoagulants sont des molécules très largement utilisées dans la lutte chimique contre les rongeurs, à l'origine de l'inhibition du recyclage de la vitamine K et par

conséquent de troubles de l'hémostase secondaire conduisant à la mort de l'individu intoxiqué des suites d'hémorragies. Cette forte pression d'utilisation est probablement à l'origine d'une part importante de la résistance aux traitements observée chez certains rongeurs. Elle représente également une problématique environnementale majeure, avec un risque d'exposition de la faune non-cible à ces molécules.

II.2. Ecotoxicité des rodenticides anticoagulants : voies d'exposition chez la faune non-cible, mitigation du risque et diagnostic des intoxications

Même si des mesures de mitigation du risque existent, l'exposition aux rodenticides anticoagulants chez les espèces non-cibles est fréquente, à la fois chez les animaux domestiques et chez la faune sauvage.

II.2.1. Caractérisation de l'exposition de la faune non-cible

On distingue plusieurs types d'exposition de la faune non-cible :

- Une exposition primaire, liée dans le cas des AVK à une consommation directe des appâts empoisonnés.
- Une exposition secondaire, notamment par ingestion de rongeurs contaminés. Cette exposition secondaire serait favorisée par le comportement des rongeurs intoxiqués, qui favorise la prédation (état léthargique, station dans des aires dégagées), ainsi que par leur mort différée, qui permet une consommation d'appâts empoisonnés sur plusieurs jours consécutifs, et ainsi une augmentation de la charge tissulaire en rodenticides (Brakes and Smith, 2005; Cox and Smith, 1992; US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2011).

Cette exposition peut aussi inclure des transferts ou de la biomagnification le long de la chaîne alimentaire, ce processus étant fréquemment associé à des contaminants lipophiliques et persistants (Bean and Rattner, 2018; Hindmarch and Elliott, 2018). La biomagnification (ou bioamplification) correspond à une augmentation progressive des concentrations en contaminants au fur et à mesure de la progression dans la chaîne trophique (Jørgensen et al., 2008).

II.2.2. Exposition de la faune domestique aux rodenticides anticoagulants

II.2.2.1. Exposition aux AVKs chez la faune domestique

Chez les animaux domestiques, l'exposition aux AVK est essentiellement primaire, au travers d'ingestions accidentelles de produits rodenticides. En effet, une intoxication secondaire par consommation de rongeurs contaminés est beaucoup moins probable chez ces espèces. Il a ainsi été

grossièrement calculé pour le chien la nécessité de consommer 500 g de rat exposé au brodifacoum (et présentant des résidus tissulaires à hauteur de 2 mg/kg) par kg de poids de chien pour atteindre la dose toxique estimée pour cette molécule de 1 mg/kg de poids vif (Murphy, 2002). Il s'agit de calculs approximatifs et présentant des limites (notamment sur la définition de la dose toxique du brodifacoum, ou encore sur l'extrapolation des concentrations tissulaires à une concentration « rat entier »), mais qui illustrent assez bien le risque faible d'intoxication secondaire chez cette espèce.

En France, deux centres anti-poisons vétérinaires enregistrent les remontées du terrain sur les expositions animales aux toxiques, et notamment aux AVK, contribuant ainsi à la vigilance sur les intoxications chez la faune domestique. Le Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires (CNITV) est un des deux centres en activité, et le plus important en termes de nombres d'appels reçus. Lefebvre et al (Lefebvre et al., 2017) se sont intéressés aux données du CNITV collectées entre janvier 2008 et février 2017. Ils ont ainsi montré qu'environ 11% des appels reçus chaque mois par le centre concernaient une exposition aux AVK, dont une majorité d'AVK de deuxième génération (60%), avec une saisonnalité significative des appels (pic entre août et octobre, diminution de décembre à avril) plutôt surprenante de prime abord car par forcément corrélée avec les périodes d'utilisation « classiques » (début de l'hiver et début du printemps) des rodenticides. Cela pourrait être lié à une consommation moins importante des appâts disposés en été et en automne par les rongeurs-cibles (disponibilité de la ressource alimentaire) ou par une visibilité plus importante des rongeurs à cette période (villes moins peuplées) entraînant un surcroît de traitements, les deux scénarios entraînant une augmentation de l'exposition des animaux non-cibles.

Les appels reçus concernaient majoritairement la faune domestique (99%), et principalement le chien (83%) (Figure 9). Selon les auteurs, cette prévalence pourrait s'expliquer par l'absence d'utilisation de stations sécurisées d'appâtage chez les particuliers, ainsi que par le comportement des chiens. Les expositions étaient majoritairement accidentelles, avec seulement 2% de suspicions d'empoisonnement volontaire. Les chats ont été identifiés comme la cible principale de ces empoisonnements volontaires (64%).

Les ruminants sont eux moins incriminés, représentant environ 2,2% des appels concernant les expositions aux rodenticides, généralement asymptomatiques dans ces espèces (89,5%) (données du CNITV). Ils sont en effet suspectés d'un manque de sensibilité à ces molécules (Berny et al., 2006).

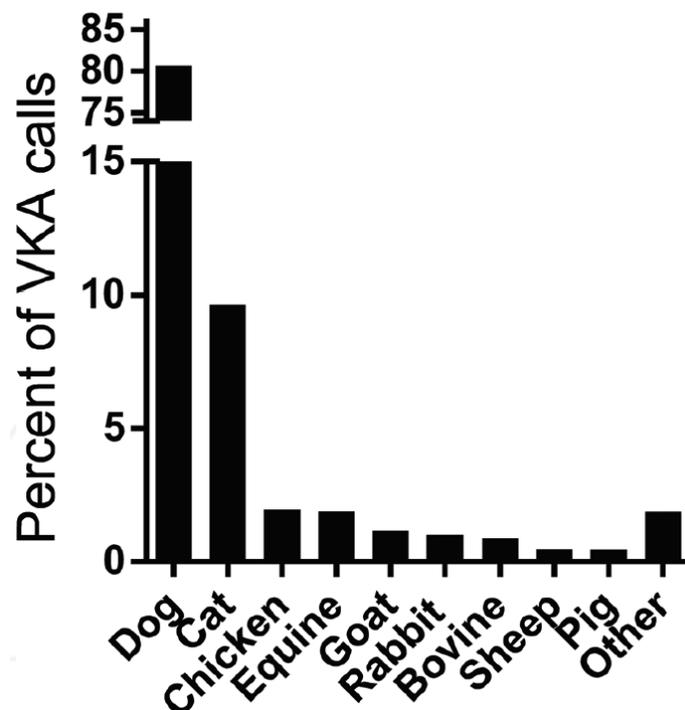


Figure 9: Espèces concernées par les appels au CNITV relatifs à une exposition aux AVK, sur la période 2008-2017 (%) (extrait de Lefebvre et al., 2017)

II.2.2.2. Consommation par les animaux de rente et risque pour la santé humaine

Les préoccupations, lors d'une exposition d'un animal domestique, diffèrent selon qu'il s'agit d'un animal de compagnie ou d'un animal de rente. Alors que chez l'animal de compagnie la prévention de l'intoxication va être l'objectif principal, chez les animaux de rente se pose la question de la contamination des denrées produites et du risque de leur consommation par l'Homme (Lefebvre et al., 2017). En effet, les rodenticides anticoagulants, lipophiles, sont transférés dans la viande (Pitt et al., 2011), les œufs (Eadsforth et al., 1993) et le lait (Bullard et al., 1977) : ainsi en cas de consommation accidentelle d'un AVK par un animal de rente, une exposition humaine est possible.

Concernant le lait, le taux de transfert des différents AVK n'est, à ce jour, que peu documenté dans la littérature. De telles explorations ne sont mentionnées que dans des références anciennes explorant les risques liés aux campagnes de régulation des chauves-souris vampires en Amérique latine, par l'administration intra-ruminale de rodenticides chez le bétail, cible de ces prédateurs (Bullard et al., 1977; Thompson et al., 1972). Sachant qu'aucune LMR (Limite Maximale de Résidus) n'existe pour les rodenticides dans les tissus animaux, aucun temps d'attente n'a été défini, questionnant ainsi la sûreté des denrées laitières destinées à la consommation humaine dans les cas d'intoxications suspectées. Cette thématique sera abordée dans le cadre de l'article 2.

L'exposition de la faune domestique aux AVK est donc principalement primaire et accidentelle, majoritairement chez le chien. L'exposition des animaux de rente pose la question de la contamination des denrées comestibles (viande, œufs, lait) par les AVK, et nécessiterait des investigations supplémentaires. Cependant l'exposition aux AVK concerne également la faune sauvage non-cible.

II.2.3. Exposition de la faune sauvage non-cible aux rodenticides anticoagulants

L'exposition chez la faune sauvage peut être à la fois primaire et secondaire. Un phénomène de biomagnification est suspecté dans le cadre de la contamination des prédateurs au sommet des chaînes trophiques.

II.2.3.1. Exposition primaire de la faune sauvage non-cible

Même si seulement quelques rongeurs sont ciblés par les traitements rodenticides, l'exposition d'autres rongeurs aux appâts peut être importante. Ainsi, au Royaume-Uni l'exposition aux AVK a été évaluée chez des rongeurs non-cibles lors de campagnes de dératisation autour de bâtiments agricoles et de mangeoires pour le gibier à plume : 48.6% des individus issus des populations locales de rongeurs avaient consommé des appâts, avec la plus haute prévalence observée chez le Mulot sylvestre *Apodemus sylvaticus*, suivi par le Campagnol roussâtre *Clethrionomys glareolus* et le Campagnol agreste *Microtus agrestis* (Brakes and Smith, 2005). Ces rongeurs pourraient également représenter une source de contaminations secondaires pour des prédateurs.

Au-delà des rongeurs, la consommation des appâts a été documentée chez d'autres animaux, notamment chez des oiseaux granivores comme le moineau domestique *Passer domesticus* (Elliott et al., 2014), des invertébrés tels que certains coléoptères (*Dermestes* spp.) ou limaces (*Deroceras reticulatum*) (Alomar et al., 2018; Elliott et al., 2014), ou encore des petits mammifères herbivores comme le lièvre ibérique *Lepus granatensis* (Sánchez-Barbudo et al., 2012) ou insectivores opportunistes tels que le hérisson européen *Erinaceus europeaus* (Dowding et al., 2010; Sánchez-Barbudo et al., 2012).

La persistance des molécules rodenticides dans les appâts, qui peut être prolongée dans certaines conditions environnementales, favorise l'exposition primaire de cette faune non-cible. Il a ainsi été montrée que la bromadiolone dans les appâts utilisés pour le contrôle du Campagnol terrestre *Arvicola terrestris* pouvait persister jusqu'à 80 jours pour les appâts disposés dans les cavités de stockage utilisées par ces rongeurs (Sage et al., 2007). Une telle persistance environnementale, associée à une persistance des AVK dans l'organisme (cf Tableau 1 concernant les demi-vies hépatiques), favorisent également les expositions secondaires et l'accumulation des AVK dans les chaînes trophiques.

II.2.3.2. Contamination des chaînes trophiques par les rodenticides anticoagulants et exposition secondaire

Selon l'Agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA), les risques secondaires d'intoxication aux rodenticides anticoagulants sont influencés par divers facteurs, incluant leur toxicité pour les consommateurs primaires et secondaire, le taux d'élimination de chaque molécule anticoagulante chez ces mêmes consommateurs, et le délai entre l'ingestion et la mort (US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2011). Ainsi les demi-vies élevées des AVK, surtout ceux de seconde génération, ainsi que la mort différée des individus les ayant ingérés, sont des facteurs favorisant une prévalence importante de l'exposition secondaire de la faune non-cible. Les rongeurs-cibles, massivement exposés lors de traitements AVK biocides ou phytopharmaceutiques (Sage et al., 2008; Tosh et al., 2012), sont une source majeure de contamination des chaînes trophiques. Cependant les autres espèces non-cibles exposées de manière primaire à ces molécules constituent également des sources d'exposition pour leurs prédateurs situés aux niveaux trophiques supérieurs (Brakes and Smith, 2005).

Des expositions secondaires de la faune sauvage aux rodenticides anticoagulants ont été rapportées chez des nombreux mammifères carnivores tels que le vison (Fournier-Chambrillon et al., 2004), le lynx (Serieys et al., 2018), l'hermine et la belette (Elmeros et al., 2011), ou encore le renard (Geduhn et al., 2015; Sage et al., 2010; Taylor et al., 2020). Il est reconnu chez d'autres mammifères, comme le hérisson *Erinaceus europeus* (insectivore opportuniste) et le sanglier *Sus scrofa* (omnivore), une possibilité d'exposition via les deux modes de contamination évoqués, primaire et secondaire (Alabau et al., 2020; Dowding et al., 2010). Certains cas d'exposition chez des reptiles ont également été rapportés (Lohr and Davis, 2018; Sánchez-Barbudo et al., 2012). Mais la littérature concernant l'exposition secondaire aux AVK est sûrement la plus abondante à propos des rapaces, avec de

nombreuses publications s'intéressant aux niveaux de contamination chez ces espèces diurnes, comme par exemple le Milan royal *Milvus Milvus*, la Buse à queue rousse *Buteo jamaicensis*, l'Aigle royal *Aquila chrysaetos* ou le Faucon crécerelle *Falco tinnunculus*, et nocturnes, comme la Chouette effraie *Tyto alba*, la Chouette hulotte *Strix aluco* ou le Hibou grand-duc *Bubo bubo*, aussi bien en Amérique du Nord (Albert et al., 2010; Murray, 2018, 2017, 2011; Rattner and Mastrota, 2018; Thomas et al., 2011) qu'en Europe (Coeurdassier et al., 2019; Langford et al., 2013; Newton et al., 1990; Sánchez-Barbudo et al., 2012; Walker et al., 2008). En effet ces derniers, au sommet de la chaîne alimentaire, sont des animaux-sentinelles intéressants dans l'évaluation de l'écotoxicité des rodenticides anticoagulants (Espín et al., 2016). Les rapaces prédateurs peuvent être contaminés via la consommation de rongeurs intoxiqués, qui, comme vu plus haut, deviennent des proies faciles, mais également via l'ingestion de petits mammifères, reptiles et oiseaux non-cibles (Hindmarch and Elliott, 2018; Nakayama et al., 2019; Rattner et al., 2014b). La Figure 10 présente un résumé de ces voies de contamination.

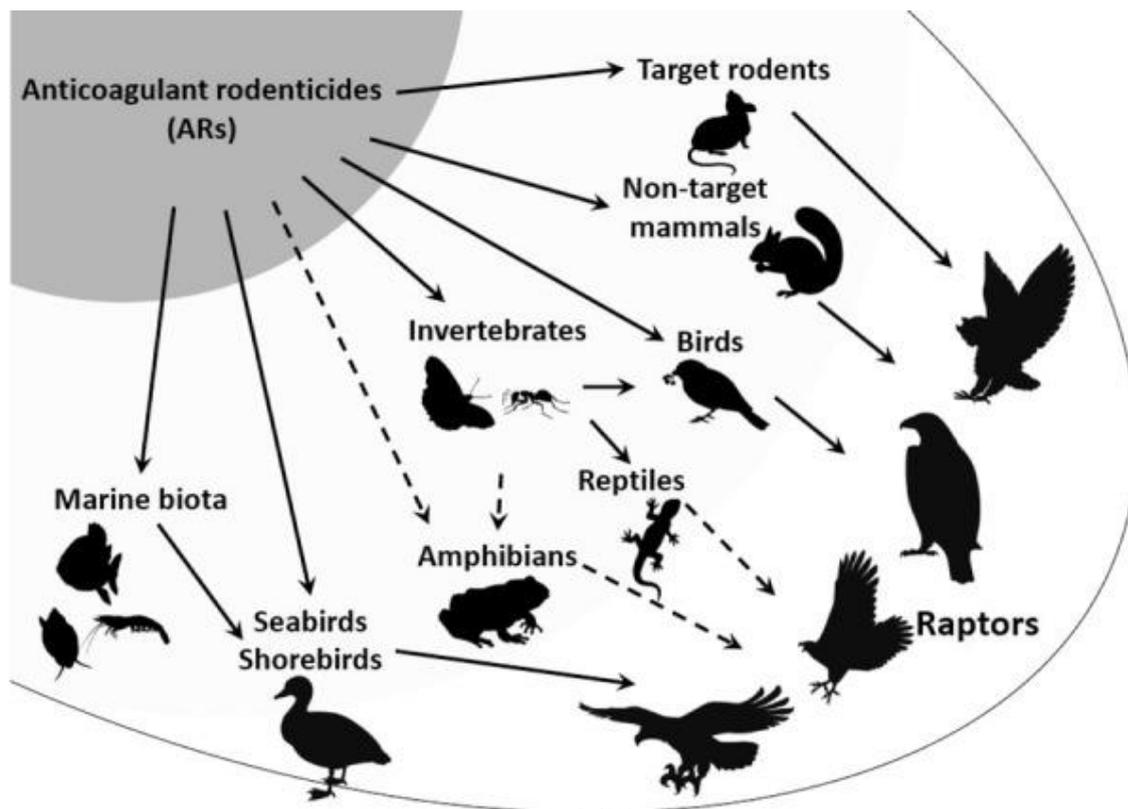


Figure 10 : Voies d'exposition des rapaces aux AVK (extrait de Nakayama et al. 2019)

Une revue récente de López-Perea et Mateo (López-Perea and Mateo, 2018) a estimé une prévalence globale de l'exposition des rapaces prédateurs aux AVK à hauteur de 58%, à partir d'études réalisées

dans divers endroits du globe. Les conclusions récurrentes de ces études sont une exposition majoritairement aux rodenticides de seconde génération, en lien avec leur persistance environnementale plus importante (Buckle et al., 1994; Giraudoux et al., 2006), avec une prévalence en augmentation (Murray, 2017, 2011) : cette dernière conclusion est cependant à relativiser par rapport à l'amélioration au cours du temps des techniques d'analyses mises en place pour détecter les rodenticides, aujourd'hui plus sensibles (Fourel et al., 2017; Rattner and Harvey, 2021). Généralement, plusieurs molécules différentes sont retrouvées dans les échantillons (Albert et al., 2010; Stone et al., 1999; Thomas et al., 2011) : cette contamination multiple suggère une exposition chronique des rapaces prédateurs aux AVK. Si l'exposition des rapaces prédateurs semble ainsi prépondérante et bien caractérisée, il est à noter qu'en revanche peu de données sont disponibles concernant l'exposition des rapaces charognards aux rodenticides anticoagulants.

De manière générale, l'exposition secondaire aux rodenticides anticoagulants a été observée en milieu rural, mais également en milieu urbain ou péri-urbain (Alabau et al., 2020). Il a même été suggéré que l'usage biocide des AVKs autour des bâtiments d'élevage et dans les zones urbaines pourrait être la voie d'exposition majeure de la faune sauvage à ces molécules (López-Perea et al., 2019).

Il est à noter cependant que, pour la faune sauvage non-cible, le taux de létalité lié aux AVK observé dans les études sur le terrain est généralement relativement faible, de l'ordre de 1-2% (Murray, 2017). Quelques taux de létalité plus élevés ont été rapportés, mais avec un possible biais d'échantillonnage, lié au fait que les échantillons inclus dans l'estimation du taux de létalité soient envoyés au laboratoire, suite à une suspicion d'intoxication (Sánchez-Barbudo et al., 2012).

II.2.3.3. Surveillance des expositions de la faune sauvage aux rodenticides anticoagulants

La caractérisation de la prévalence de l'exposition aux AVK et des voies de contamination des chaînes trophiques par ces molécules nécessite la mise en place de moyens de surveillance des populations non-cibles. Cependant, les efforts de veille toxicologiques sont peu coordonnés à l'échelle européenne (Badry et al., 2020; Espín et al., 2016; Gómez-Ramírez et al., 2014), alors que cette veille peut fournir des informations importantes pour caractériser et prévenir les effets délétères des contaminants environnementaux sur les écosystèmes et sur l'Homme (Woodruff, 2011).

Ainsi de nombreuses études visant à caractériser l'exposition de la faune non-cible émanent de laboratoires d'analyses toxicologiques, comme c'est le cas pour l'étude menée en Espagne par Sánchez-Barbudo et ses collègues (Sánchez-Barbudo et al., 2012) : les échantillons ont été collectés

par leur laboratoire auprès de centres de soins, des autorités gouvernementales, d'associations de chasse, et d'ONGs, généralement suite à une suspicion d'intoxication. Ce type de collecte, sans systématisation, risque d'induire un biais dans l'estimation de la prévalence d'exposition, qui pourrait être surestimée si elle ne se base que sur des échantillons collectés dans le cadre de suspicion préalable d'intoxication. De la même manière, en France, le réseau SAGIR, dont l'objectif premier est la surveillance des maladies infectieuses chez les oiseaux et mammifères sauvages (<https://ofb.gouv.fr/le-reseau-sagir>), contribue à surveiller les effets non intentionnels des pesticides sur la faune non-cible, mais sur le modèle d'une vigilance opportuniste en lien avec des suspicions d'événements de contamination (Millot et al., 2017).

Certains programmes de réintroduction d'espèces menacées, e.g. le LIFE GYPCONNECT qui vise à réintroduire le Gypaète barbu *Gypaetus barbatus* en France (<https://gypaetebardu.fr/life-gypconnect/>), intègrent un monitoring toxicologique plus systématique associé à leur veille sur la mortalité des rapaces dans la zone de réintroduction : ce type de surveillance peut être intéressante pour mieux caractériser l'exposition des populations de rapaces aux AVK. On peut également citer le projet LIFE APEX (<https://lifeapex.eu/>) qui vise à coordonner et systématiser le biomonitoring de la contamination des chaînes trophiques à l'échelle européenne.

II.2.4. Quelles mesures de mitigation du risque d'exposition de la faune non-cible ?

Comme vu précédemment, l'exposition de la faune non-cible aux AVK est relativement prépondérante. Des mesures de mitigation sont nécessaires pour réduire cette exposition. Nous tâcherons ici de faire un récapitulatif des mesures existantes et envisageables.

II.2.4.1. Une réglementation visant à limiter l'impact des biocides et PPP sur la faune non-cible

La Directive 2009/128/CE (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32009L0128>) a instauré en Europe un cadre d'action communautaire pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable. Cette législation a été publiée pour encadrer les usages phytopharmaceutiques, sans exclure une potentielle extension aux biocides (considérant (2) de la Directive). Elle fait miroir aux efforts internationaux coordonnés par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) dans la réduction des risques associés à l'usage des pesticides (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/pesticideriskreduction.htm>). En France,

les exigences de la Directive 2009/128/CE se sont déclinées via les plans Ecophyto et Ecophyto II+ (<https://agriculture.gouv.fr/ecophyto>) : le premier (2008-2018) visait un objectif de réduction de 50% des usages de pesticides sur 10 ans, non atteint, qui a été repris par le second plan (2020-2025), avec un renforcement des mesures de transparence et un objectif supplémentaire de sortie rapide du glyphosate.

Concernant plus particulièrement les rodenticides anticoagulants, une des premières mesures réglementaires de mitigation du risque lié à ces molécules a été une restriction des usages, avec un retrait de toutes les autorisations de mise sur le marché (AMM) pour les produits phytopharmaceutiques (cf paragraphe II.1.2.3). La réglementation française (Arrêté du 09/11/2013) prévoit également une formation obligatoire des professionnels qui achètent, utilisent ou distribuent des produits biocides (Certibiocide), dont les rodenticides TP14 (<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000028214219/>). D'autres mesures ont été mises en place à l'échelle nationale et européenne, comme la restriction des volumes de vente pour les particuliers (1,5 kg), la régulation des présentations (interdiction des poudres de piste et des appâts huileux), ou encore la présence obligatoire d'agents amérissants (Lefebvre et al., 2017).

Les rodenticides anticoagulants sont efficaces à faible dose, ce qui permet de limiter leur concentration dans les appâts et donc leur toxicité primaire pour les animaux non-cibles. De plus, suite à la parution du Règlement européen 2016/1179 (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2016/1179/oj>), les concentrations en AVK pour les produits biocides ont été encore réduites, en-dessous de 30 ppm alors qu'elles étaient traditionnellement plutôt autour de 50 ppm voire plus (Frankova et al., 2019). Cette réduction est intervenue afin d'éviter le reclassement des rodenticides concentrés à plus de 0.003% comme « toxiques pour la reproduction », et ainsi, en lien avec la BPR, l'interdiction de leur usage pour les particuliers.

La régulation des usages des AVK a également été marquée par l'encadrement européen des pratiques d'appâtage, avec l'obligation pour les professionnels d'utiliser des stations protectrices afin de limiter le contact de la faune non-cible avec les AVK utilisés comme biocides à partir de 2013 (Berny et al., 2014; Nakagawa et al., 2015; Suárez and Cueto, 2018). Suite à cette mesure, il a été observé en France une baisse significative des appels au CNITV concernant une exposition de la faune domestique aux rodenticides anticoagulants (Lefebvre et al., 2017). Cependant l'efficacité de cette mesure reste discutable et mériterait plus d'investigations, notamment concernant son impact sur l'exposition de la faune sauvage : en effet, les mammifères et oiseaux non-cibles de petite taille peuvent accéder aux appâts dans les stations (Elliott et al., 2014), et ainsi initier la contamination des

chaînes trophiques par ces molécules. De plus, l'usage des stations n'est obligatoire que pour les professionnels, les particuliers peuvent donc continuer à utiliser des formulations en libre accès.

Une autre régulation des usages concerne la notion d'appâtage permanent. Ainsi, au titre de la réglementation, pour les produits à base de flocoumafène, de diféthialone, de coumatétralyl, de chlorophacinone et de brodifacoum, l'appâtage permanent est strictement interdit, tandis que pour les produits contenant du difénacoum et de la bromadiolone, l'appâtage permanent peut être autorisé pour des usages par des professionnels formés et uniquement sur les sites présentant un risque élevé de réinvasion lorsqu'il est avéré que les autres méthodes de lutte ne suffisent pas. En France, l'utilisation des produits AVK pour de l'appâtage permanent n'a jamais été réellement autorisée, quand bien même son interdiction n'était pas explicitement mentionnée dans les autorisations de produits initiales. Les décisions renouvelant l'approbation du difénacoum et de la bromadiolone en 2017 à l'échelle européenne ont introduit la possibilité d'autoriser cet usage pour les professionnels entraînés. Alors que certains Etats-membres ont choisi d'emblée d'étendre les conditions d'autorisation de certains produits destinés aux professionnels et contenant de la bromadiolone ou du difénacoum, en autorisant explicitement l'appâtage permanent, la question est actuellement débattue en France, sur l'utilité et l'efficacité de cette technique (https://www.anses.fr/fr/system/files/PV_CSAMM_2021-01_BIOCIDES.pdf).

II.2.4.2. Vers une diminution de l'usage des rodenticides anticoagulants grâce à la lutte intégrée contre les rongeurs nuisibles ?

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la lutte intégrée contre les rongeurs nuisibles (Integrated Pest Management – IPM) consiste en la prise en considération exhaustive de toutes les techniques de lutte disponibles contre les organismes nuisibles puis en l'intégration des mesures propres à enrayer le développement des populations d'organismes nuisibles. Elle associe les stratégies et les pratiques de gestion (culturale) biologique, chimique et physique propres à chaque espèce pour favoriser la production de cultures saines et limiter autant que possible l'emploi de pesticides, contribuant ainsi à réduire et à atténuer les risques que les pesticides présentent pour la santé humaine et l'environnement (<http://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/integrated-pest-management/fr/>).

Cette approche est promue en Europe via la Directive 2009/128/CE, et est déclinée en France au travers d'une action du plan Ecophyto, EcophytoPIC (Protection Intégrée des Cultures - <http://ecophytopic.fr/>). La lutte contre le campagnol terrestre *Arvicola terrestris* a fait l'objet d'un

projet du Ministère de l'Alimentation et de l'Agriculture entre 2007 et 2009, le « Projet campagnol » (Projet CASDAR), s'inscrivant dans EcophytoPIC (<https://ecophytopic.fr/recherche-innovation/piloter/projet-campagnols>). Ce projet, initié sur le constat d'une augmentation de la fréquence et de la sévérité des pullulations des campagnols dans les zones herbagères d'altitude auvergnates est constatée provoquant des pertes de fourrages, avec des répercussions sur la qualité des produits animaux, l'équilibre floristique des prairies et la santé humaine, a rassemblé des acteurs du monde agricole en Auvergne et Franche-Comté afin de promouvoir la lutte intégrée contre ce nuisible, notamment via une réflexion sur les alternatives à la lutte chimique par la bromadiolone. Cette lutte repose entre autres sur une favorisation de la présence des prédateurs du campagnol, sur l'emploi de méthodes physiques comme le piégeage, sur la gestion des parcelles (entretien des bordures, alternance entre fauche et pâture, travail du sol...) ou encore sur une utilisation raisonnée de la lutte chimique à la bromadiolone, autorisée uniquement en-dessous d'un certain seuil d'infestation des parcelles, au-delà duquel elle deviendrait inefficace et réellement dangereuse pour la faune non-cible (Figure 11).

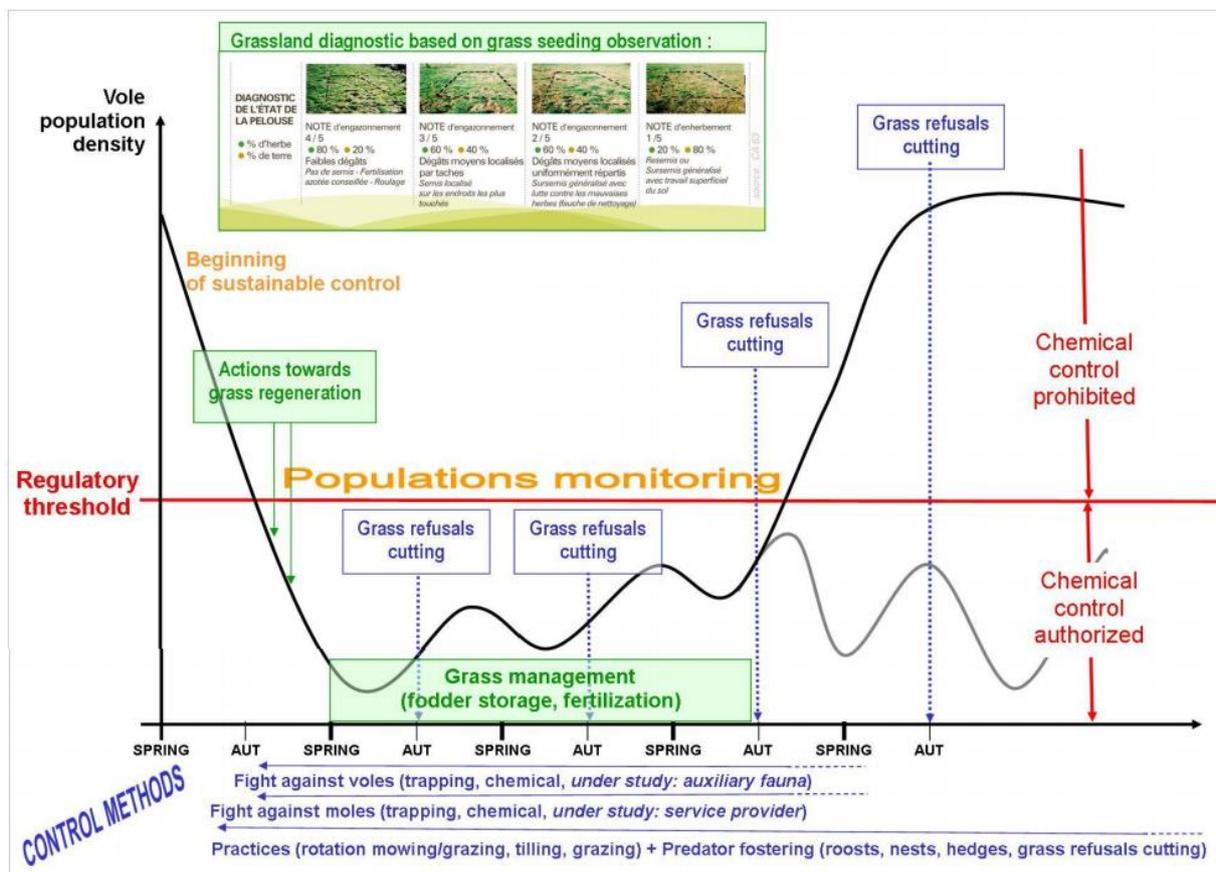


Figure 11: Utilisation de la lutte intégrée pendant le cycle de croissance d'*Arvicola terrestris* (Giraudeau et al., 2012)

Cependant, suite aux suspensions d'AMM des produits AVK utilisés comme PPP, la lutte intégrée en agriculture, telle que décrite ci-dessus, semble d'un intérêt moindre pour réduire l'exposition de la faune non-cible aux AVK, puisque ces molécules ne font désormais plus partie des moyens de lutte disponibles. Mais il est à noter que ce concept peut se décliner pour l'usage biocide des AVK, et qu'il est d'ailleurs prévu dans l'Article 18 de la BPR, qui stipule que la Commission Européenne doit démontrer que la réglementation contribue à l'usage durable des produits biocides, notamment par le développement et l'application de moyens de lutte intégrée pour encadrer l'usage de ces produits.

II.2.4.3. La stéréochimie au service d'une réduction de l'écotoxicité des rodenticides anticoagulants ?

Il a été vu précédemment que les mesures réglementaires en place ne semblent pas suffire pour gérer de manière efficace l'exposition de la faune non-cible aux AVK. Ces molécules sont candidates à une substitution dans le cadre de la BPR, mais à ce jour aucune substance alternative n'a pu montrer un profil d'efficacité et d'innocuité satisfaisant pour remplacer les AVK, qui demeurent autorisés à l'heure actuelle.

Depuis quelques années, des recherches menées sur les différences de puissance et de toxicité entre les stéréoisomères des rodenticides de deuxième génération montrent une voie intéressante de développement de nouveaux rodenticides efficaces et plus écologiques (Damin-Pernik et al., 2016; Fourel et al., 2021, 2017b; Lefebvre et al., 2020). En effet, comme décrit plus haut (II.1.2.4. Propriétés physico-chimique et pharmacocinétiques des rodenticides anticoagulants), les rodenticides anticoagulants sont des molécules chirales, qui possèdent deux carbones asymétriques pour ceux de deuxième génération. Les premiers travaux se sont intéressés à la diastéréoisomérisation de ces AVK, chaque rodenticide mis sur le marché étant un mélange de deux diastéréoisomères appelés de manière simplifiée *cis* et *trans*, en proportions définies par le fabricant (Damin-Pernik et al., 2017). Il a été montré que ces diastéréoisomères possédaient une cinétique d'élimination différente, avec l'un des deux étant systématiquement éliminé plus rapidement que l'autre, mais montraient en revanche une efficacité similaire dans l'inhibition de l'activité VKOR. Ainsi, le développement d'appâts contenant uniquement le diastéréoisomère le moins persistant pourrait limiter l'exposition de la faune non-cible. Plus récemment, grâce à l'amélioration des performances des techniques d'analyses chromatographiques, il a été possible d'isoler et de caractériser les différents

stéréoisomères des rodenticides de deuxième génération, au nombre de 4 (Lefebvre et al., 2020) : il a ainsi été montré pour la diféthialone que les 4 stéréoisomères (nommés E1-trans, E2-cis, E3-cis, et E4-trans) présentaient des cinétiques d'élimination différente, avec une demi-vie initiale la plus basse pour E4-trans (6,0h), et maximale pour E3-cis (82,3h). Là encore, le potentiel d'inhibition de VKORC1 demeurait le même quel que soit le stéréoisomère concerné. Ainsi l'incorporation préférentielle de la forme E4-cis de la diféthialone dans les appâts pourrait limiter encore plus le risque d'exposition de la faune non-cible.

Nous avons donc vu que l'exposition de la faune non-cible, primaire ou secondaire, était relativement prévalente malgré les mesures de mitigation en plus. Cependant, pour caractériser le risque pour les écosystèmes lié à l'usage des AVK, il convient d'être capable d'évaluer correctement leur toxicité pour les organismes non-cibles, en distinguant exposition asymptotique et intoxication. Cette problématique est l'objet du paragraphe suivant.

II.3. Quels marqueurs potentiels de la toxicité des rodenticides anticoagulants ?

Dans les domaines de la toxicologie et de l'écotoxicologie, le risque représenté par une substance pour une population est une combinaison du danger (toxicité) de cette substance et de la magnitude de l'exposition à la substance de la population considérée. Quantifier le risque inhérent à un produit permet d'évaluer sa balance bénéfique/risque, et donc son maintien ou non sur le marché. Il est ainsi important d'être en mesure de caractériser le risque lié à l'exposition de la faune non-cible aux AVK : comme vu plus haut, on observe une exposition relativement ubiquitaire de cette faune non-cible, mais quels sont les effets réels de cette exposition sur les individus et les populations ?

Cette partie s'intéresse à la caractérisation des effets des rodenticides anticoagulants sur la faune non-cible, et à la distinction complexe entre exposition environnementale et intoxication réelle par ces molécules. Elle fait l'objet d'un article de revue réalisé dans le cadre de ce travail de thèse (**article 1**) et reprendra donc dans les grandes lignes le contenu de cette revue.

II.3.1. Le tableau clinique, premier indicateur de la toxicité des rodenticides ?

Classiquement, les manifestations cliniques d'une intoxication aux rodenticides anticoagulants sont le reflet de leur mécanisme d'action : en agissant sur l'hémostase secondaire, les AVK sont à l'origine d'un tableau hémorragique. Ainsi, pour la faune sauvage non-cible, les diagnostics *ante-mortem* et *post-mortem* des intoxications aux rodenticides combinent généralement un tableau clinique hémorragique associé à une détection de molécules AVK dans les tissus, généralement au niveau du foie (Murray, 2018). Cependant, toute exposition aux AVK n'entraîne pas systématiquement ce type de symptômes, rendant plus complexe l'évaluation de la toxicité de ces molécules.

II.3.1.1. Toxicité aiguë des AVK et manifestations cliniques de l'intoxication

II.3.1.1.1. Quelle mesure de la toxicité aiguë des AVK ?

Comme pour tous les xénobiotiques, la toxicité aiguë des AVK et leurs effets létaux peuvent se mesurer grâce à la dose médiane létale (DL50, en mg/kg). Chez les oiseaux, on retrouve également la concentration médiane létale, correspondant à la dose ingérée (CL50, en mg/kg de nourriture). Ces doses, basées sur des données de toxicité sur des espèces de référence comme le rat de laboratoire

Rattus norvegicus ou des espèces aviaires comme le Colin de Virginie *Colinus virginianus*, la Caille japonaise *Coturnix coturnix* ou encore le Canard colvert *Anas platyrhynchos*, varient fortement selon l'AVK et/ou l'espèce considérés. Ainsi, la DL50 de la bromadiolone chez le Colin de Virginie est plus de 100 fois supérieure à celle mesurée chez le rat (Rattner and Mastrotta, 2018). L'extrapolation des valeurs toxiques d'une espèce à l'autre peut se faire en utilisant des facteurs allométriques affectés au poids corporel, généralement estimés pour les mammifères entre 0,67 et 0,75. Cependant cette extrapolation semble moins évidente chez les oiseaux, pour qui ces facteurs seraient généralement plutôt supérieurs à 1, et varient grandement selon le toxique considéré (Mineau et al., 1996). Il semble également que les espèces aviaires de laboratoire utilisées pour définir ces valeurs de référence soient beaucoup moins sensibles aux effets des AVK que les espèces sauvages de rapaces par exemple, comme le Faucon crécerelle d'Amérique (*Falco sparverius*) ou le Petit-Duc maculé (*Megascops asio*) (Rattner et al., 2020, 2014a). Ces différences de sensibilité, déjà évoquées au paragraphe II.1.4. Différences de sensibilité et résistance aux rodenticides anticoagulants, pourraient également être liées à d'autres facteurs comme l'état nutritionnel ou le degré d'activité (e.g. sédentaire vs actif) qui diffèrent entre des conditions contrôlées de laboratoire et celles de la vie réelle (Rattner and Harvey, 2021). Ainsi il ne semble pas aisé de prédire des effets potentiels sur la faune non-cible à partir de ces valeurs toxiques. De plus, ces valeurs correspondent à des doses auxquelles 50% des effectifs du groupe testé en laboratoire ont succombé suite à l'administration de la molécule : on peut donc s'attendre à la survenue d'effets délétères sur les organismes exposés pour des doses inférieures.

II.3.1.1.2. Des manifestations cliniques de type hémorragique, non spécifiques

Les manifestations cliniques d'une intoxication aux rodenticides sont relativement similaires chez toutes les espèces de vertébrés : un syndrome hémorragique, dont les localisations principales sont le tractus respiratoire (toux/hémoptisie, saignements nasaux, œdème pulmonaire, hémorragies pulmonaires et pleurales) et le tractus digestif (hématémèse, hématochézie, méléna). D'autres symptômes moins spécifiques peuvent être observés, comme la léthargie, l'anorexie, la pâleur des muqueuses ou encore l'ataxie (Berry et al., 1993; Murphy, 2002; Petterino et al., 2004; Sheafor and Couto, 1999; Woody et al., 1992). Les manifestations cliniques apparaissent généralement 2 à 10 jours suite à l'ingestion (Lefebvre et al., 2017; Woody et al., 1992). Le tableau clinique est repris plus en détails selon les espèces (chien, ruminants, chevaux, oiseaux de proie) dans l'**article 1** (paragraphe 2.4.1), avec une mention à la possible sensibilité moindre des ruminants aux intoxications aux AVK : en effet ces espèces ne montrent que très rarement des signes cliniques évidents d'intoxication.

La présence d'hémorragies peut être un marqueur important de la toxicité des AVK, utilisable aussi bien chez l'animal vivant que mort. Cependant, ce marqueur n'est pas spécifique, puisque les hémorragies peuvent également résulter d'autres causes comme un traumatisme, en lien ou non avec une potentielle intoxication aux rodenticides : il est suspecté que les AVK pourraient augmenter le risque de mort par trauma, mais cela reste une hypothèse qui nécessite d'être explorée (Elmeros et al., 2011; Fournier-Chambrillon et al., 2004) ; d'autres causes, comme une affection de type leptospirose (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1998), peuvent également être l'origine de saignements. Ainsi, la présence seule d'hémorragies chez un individu exposé ne suffit pas à conclure à une intoxication aux AVK.

II.3.1.2. Exposition chronique et effets sub-cliniques de rodenticides anticoagulants.

Les signes cliniques d'une exposition chronique aux AVK sont peu caractérisés et sont peu exploitables dans le diagnostic d'une intoxication à l'échelle individuelle. Il semblerait qu'une exposition répétée aux AVK pourrait accroître la sensibilité des animaux exposés à ces molécules (Rattner et al., 2018), augmentant ainsi le risque d'effets sub-léthaux chez ces individus. Comme vu plus haut, parmi ces effets sub-léthaux, une sensibilité accrue aux traumatismes est suspectée (Elmeros et al., 2011; Fournier-Chambrillon et al., 2004).

Certaines études suggèrent également que les effets de ces molécules ne se limitent pas seulement à la coagulation, mais pourraient affecter d'autres voies métaboliques en affectant le fonctionnement d'autres protéines vitamine-K dépendantes (voir paragraphe II.1.3.3. D'autres rôles physiologiques associés à des protéines vitamine-K dépendantes (PVKD)). Ainsi, l'effet d'une exposition aux AVK sur le métabolisme osseux, notamment sur la densité osseuse et sur le risque de fractures, a été investigué chez des rapaces, sans résultats conclusifs (Knopper et al., 2007). D'autres études chez l'humain et le rat décrivent une relation entre l'exposition à la warfarine et l'apparition de calcifications vasculaires (Koos et al., 2005; Price et al., 1998).

Au-delà de possibles actions identifiées comme liée à des PVKD, les AVK sont également suspectés d'influer sur la réponse immunitaire des animaux exposés : ainsi il a été observé une recrudescence de cas fatals de gale notoédrique chez des lynx (*Lynx rufus*) contaminés par les AVK. Les effets des AVK sur le fitness des animaux exposés nécessitent donc plus d'investigations, à élargir notamment à l'échelle populationnelle, afin de mieux appréhender toutes les voies potentielles d'effets indésirables de ces molécules, selon la méthode mécanistique d'Adverse Outcome Pathway (AOP)(Rattner et al., 2014b).

II.3.1.3. Des expositions asymptomatiques aux AVK

En lien avec la différence de sensibilité entre les espèces, avec le niveau d'exposition ou encore avec le délai suite à l'exposition, certains individus peuvent ne pas présenter de manifestations cliniques alors qu'ils ont été exposés à des AVK. Si l'absence de troubles cliniques est plutôt bénéfique pour l'individu concerné, elle n'exclut pas le risque potentiel de contamination des denrées alimentaires si l'animal considéré est un animal de rente (voir paragraphe II.2.2.2. Consommation par les animaux de rente et risque pour la santé humaine), ni celui d'exposition secondaire de prédateurs de cet individu.

Ainsi, le tableau clinique ne semble pas un indicateur suffisant pour caractériser la toxicité, et donc le danger représenté par les rodenticides anticoagulants, et d'autres marqueurs sont nécessaires pour contribuer à l'évaluation du risque pour la faune non-cible représenté par ces molécules.

II.3.2. D'autres biomarqueurs pour mieux caractériser la toxicité des rodenticides anticoagulants ?

II.3.2.1. Qu'est-ce qu'un biomarqueur en écotoxicologie ?

Un biomarqueur est un paramètre mesurable au niveau biochimique, histologique, immunologique, physiologique ou organique, utilisé comme indicateur d'un état biologique (López-Barea, 1995). On distingue communément les biomarqueurs d'exposition, qui sont utiles pour l'identification du danger (identification du xénobiotique et de ses métabolites, par exemple) et les biomarqueurs d'effet, qui vont servir à l'évaluation de ce danger en mesurant la réponse de l'organisme suite à l'exposition à un ou plusieurs xénobiotiques. On peut également évoquer une troisième catégorie, les biomarqueurs de susceptibilité, qui vont servir à mesurer la capacité innée ou acquise d'un organisme de moduler sa réponse à une exposition à un xénobiotique spécifique (e.g., phénomène de résistance).

Les biomarqueurs sont mesurés à différentes échelles (Porte-Visa et al., 2005; van der Oost et al., 2003), et peuvent ainsi consister en des enzymes inductibles intervenant dans le catabolisme des xénobiotiques (enzymes de phase I comme les isoformes du cytochrome P450, ou de phase II comme la glutathion-S-transférase), mais également en des paramètres de stress oxydatifs, des produits de

biotransformation dans les fluides corporels, des protéines de stress, des paramètres hématologiques (comme par exemple l'acide delta-aminolévulinique déshydratase – ALAD – un biomarqueur applicable à l'intoxication au plomb), ou encore des marqueurs immunologiques, reproductifs, endocriniens, neuromusculaires (ex : inhibition de l'acétylcholinestérase par les pesticides organophosphorés et carbamates), génotoxiques (ex : adduits d'ADN), physiologiques ou morphologiques (ex : développement asymétrique, variation de taille d'organe).

L'interprétation des biomarqueurs est cependant sujette à caution, en prenant en compte que l'extrapolation d'une espèce à une autre, ou des conditions contrôlées de laboratoire au terrain, n'est pas toujours possible, et que l'impact d'autres facteurs de confusion non liés au contaminant étudié (variations liées à l'état de santé, au genre, à l'âge, au statut nutritionnel, à la densité de la population étudiée, à la saison, à la température etc...) doit être pris en compte (Porte-Visa et al., 2005). Cependant ces marqueurs demeurent intéressants pour des espèces rares ou à longue espérance de vie, pour lesquelles des marqueurs non invasifs sont nécessaires.

II.3.2.2. Quels biomarqueurs seraient utilisables dans le cas des AVK ?

Le Tableau 4 reprend de manière résumée les différents biomarqueurs potentiels discutés dans l'**article 1**, en tentant de répondre à plusieurs critères de choix pour ces biomarqueurs :

- Le stade de développement du marqueur,
- Son utilisation sur individu mort et/ou vivant,
- L'existence de valeurs-seuil de référence pour ce marqueur,
- La compatibilité du marqueur avec un éventuel traitement de l'intoxication à la vitamine K,
- Sa sensibilité,
- Sa spécificité,
- Sa significativité toxicologique.

Tableau 4 : Biomarqueurs potentiels pour évaluer l'exposition et les effets des AVK chez la faune

Biomarqueur	Echantillon	Ce qui est mesuré	Méthode de dosage	Stade de développement (expérimental/ recherche/ disponible)	Animal mort ou vivant	Stabilité dans le temps	Valeurs seuils disponibles	Compatibilité avec un traitement à la vitamine K	Sensibilité	Spécificité	Significativité toxicologique
Dosage des AVKs	Foie	Niveaux d'AVK dans les tissus – la détection peut être stéréospécifique	Généralement LC-MS/MS	Disponible	Mort (ou biopsie)	Très stable	Non	Oui	Elevée	Elevée	Une valeur seuil a été proposée pour les rapaces (100-200 ng/g), qui doit encore être investiguée
	Plasma				Vivant		Non	Oui	Faible		
	Fèces				Vivant ou fraîchement mort		Non	Oui	Faible		
Temps de Quick (TQ)	Plasma sur un tube citraté	Ratio basé sur le temps de coagulation d'un plasma citraté, sans plaquettes et enrichi en calcium et en thromboplastine	Mesure standardisée du TQ	Disponible	Vivant	Non documenté	Disponible pour les animaux domestiques	Non	Moyenne	Moyenne	Importante dans les cas d'exposition aiguë
Facteurs de coagulation vitamine-K dépendants	Plasma sur un tube citraté	Activité du facteur de coagulation	Dosage chromogénique	Recherche	Vivant	Non documenté	Non chez l'animal	Non	Moyenne	Elevée	Importante dans les cas d'exposition aiguë
Ostéocalcine sous-carboxylée	Plasma	Pourcentage d'ostéocalcine sous forme sous-carboxylée dans l'échantillon	Dosage radio-immunologique ou ELISA	Expérimental	Vivant	Non documenté	Non documenté	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue

Protéine matricielle Gla (MGP) sous-carboxylée	Plasma, quelques tissus autres	Fraction sous-carboxylée, inactive, de la MGP	Dosage radio-immunologique ou ELISA	Expérimental	Vivant ou mort selon le tissu considéré	Non documenté	Non documenté	Inconnue	Inconnue	Inconnue	Inconnue
Activité VKOR dans le foie	Foie	Capacité de production de vitamine K quinone depuis la forme époxyde	Dosage enzymatique	Recherche	Mort	Stockage immédiat à -80°C nécessaire	Non documenté	Non documenté	Non documenté	Non documenté	Permet d'évaluer un mécanisme de résistance
Activité VKOR de la protéine VKORC1 exprimée dans une levure ou une cellule	ADN ou séquences de VKORC1	Capacité de production de vitamine K quinone depuis la forme époxyde Capacité à produire des protéines carboxylées	Dosage enzymatique Dosage cellulaire	Recherche	Vivant	Longue	Non documenté	Non documenté	Non documenté	Non documenté	Permet d'évaluer un mécanisme de résistance
Vitamines de la vitamine K	Foie, rein ou poumon	Vitamine K1 et MK-4, sous formes quinone et oxydée	HPLC-fluorescence	Expérimental	Mort	Relativement stable à température ambiante	Les formes époxydes sont absentes chez les animaux sains	Oui	Non documenté	Assez élevée (données de l'auteur)	Importante dans les cas d'exposition aiguë, non connue dans les cas d'exposition chroniques

II.3.2.2.1. Intérêt des concentrations en AVK dans les tissus comme biomarqueur d'exposition

Parmi les biomarqueurs recensés, l'utilisation des taux d'AVK dans divers tissus comme marqueur d'exposition a reçu un intérêt certain. Les AVK peuvent être détectés de manière non invasive dans le plasma (Laas et al., 1985; O'Bryan and Constable, 1991; Seljetun et al., 2018; Waddell et al., 2013), le lait (Bullard et al., 1977) et les fèces (Jacquot et al., 2013; Sage et al., 2010; Seljetun et al., 2020, 2018), et de manière invasive dans les organes-cibles, notamment le foie, qui est largement utilisé dans les investigations post-mortem chez la faune sauvage (Butler, 2011; Murray, 2018, 2011; Rattner et al., 2020, 2014b; Thomas et al., 2011). Les analyses sont généralement réalisées via une chromatographie liquide de haute performance couplée à une détection UV, par fluorescence (Waddell et al., 2013) ou par spectrométrie de masse (Fourel et al., 2020, 2017; Sage et al., 2010; Thomas et al., 2011).

Les investigations chez la faune sauvage visent à déterminer une valeur-seuil permettant de différencier exposition et intoxication aux AVK, afin de mieux évaluer leur impact sur les populations non-cibles. Un seuil régulièrement cité est celui proposé initialement par Newton et al. (Newton et al., 1999), à hauteur de 100 à 200 ng/g de matière fraîche (MF), même si des épisodes de létalité ont été observés pour des doses moindres : ainsi une méta-analyse canadienne a estimé une probabilité d'intoxication de 5% chez les rapaces présentant des résidus dans le foie à hauteur de 20 ng/g MF, et une probabilité de 20% chez ceux présentant des concentrations hépatiques atteignant 80 ng/g MF. Une des limites d'un tel seuil est liée à la différence de sensibilité aux AVK entre les espèces (Rattner et al., 2020), qui ne permet pas de l'extrapoler, d'autant plus que, comme vu plus haut, les valeurs toxiques retrouvées chez les animaux élevés en captivité pourraient être plus hautes que chez les animaux sauvages, soumis à des activités quotidiennes plus intenses et à plus de stress environnemental. De même, un tel seuil ne prendrait pas en compte les éventuels effets sub-léthaux liés à une accumulation de résidus suite à une exposition répétée. Enfin, ce seuil correspond à une sommation de tous les résidus AVK trouvés dans l'échantillon de foie (plus particulièrement les AVK de seconde génération) : or une telle sommation, exprimée en ng/g MF, ne prend pas en compte les différences de puissance entre les différents AVK de seconde génération retrouvés, basées sur leur potentiel d'inhibition de VKORC1. Il a été suggéré d'utiliser une quantification en masse molaire des résidus détectés (nmol/g MF), qui reflèterait de manière plus exacte le potentiel inhibiteur de chaque AVK présent dans l'échantillon analysé (Rattner et al., 2020). Une telle hypothèse mérite des investigations supplémentaires afin de voir si elle pourrait améliorer le diagnostic des intoxications aux AVK chez la faune non-cible.

II.3.2.2.2. L'exploration des voies de la coagulation, marqueur de l'effet des rodenticides anticoagulants

Sachant que l'action principale des AVK se situe sur la cascade de coagulation, il semble pertinent d'utiliser des outils diagnostiques d'exploration de cette cascade, applicables pour les individus vivants. Parmi les tests utilisables pour cette exploration, on pourra écarter d'emblée le temps de saignement (exploration de l'hémostase primaire) et le temps de coagulation sur tube sec (exploration de la coagulation de manière globale), peu spécifiques et peu sensibles.

A l'inverse, le temps de Quick (TQ), également appelé temps de prothrombine, mesuré sur un échantillon de plasma citraté, est considéré comme un test sensible et spécifique d'exploration des voies exogène et commune de la coagulation (facteurs I, II, V, VII et X). Brièvement, le calcium présent dans l'échantillon de sang total est lié par le citrate sodique, ce qui empêche la coagulation de l'échantillon. On ajoute alors de la thromboplastine tissulaire (facteur III) adjuvée de calcium dans le plasma séparé par centrifugation, et le temps de coagulation est évalué (Triplett and Harms, 1981a). Le TQ est le premier paramètre de coagulation à être affecté suite à une exposition aux AVK, en raison de la courte demi-vie du facteur VII (6,2 heures) (Hellemans et al., 1963; Murphy, 2012). Il est intéressant de noter que le Temps de Céphaline Activée (TCA) est également augmenté au cours d'une intoxication aux AVK, mais généralement lors de stades plus avancés (à partir de 3 jours) : ce test, également sensible, sert à l'exploration de la voie intrinsèque de la coagulation (Triplett and Harms, 1981b), et est donc considéré comme moins spécifique que le TQ. Le temps de thrombine, qui évalue le temps nécessaire à la formation d'un thrombus dans une solution standard de thrombine, et correspond donc à la mesure du taux de transformation du fibrinogène plasmatique en fibrine (Triplett and Harms, 1981c), n'est, lui, pas modifié lors d'une intoxication aux AVK, sauf dans des stades très avancés (hémorragies massives avec épuisement des capacités de coagulation). Ainsi, parmi les outils d'exploration de la coagulation, le TQ est considéré comme le marqueur le plus spécifique et constitue ainsi le « standard clinique » pour le diagnostic de l'intoxication aux AVK (Lefebvre et al., 2017; Murphy, 2002; Rozanski et al., 1999; Waddell et al., 2013; Woody et al., 1992).

L'utilisation du TQ comme outil diagnostique pour les intoxications aux AVK a été largement décrite chez le chien (Berry et al., 1993; Griggs et al., 2016; Petterino et al., 2004; Rozanski et al., 1999; Sheafor and Couto, 1999; Waddell et al., 2013; Woody et al., 1992). Chez cette espèce, la valeur basale se situe autour de 6 à 10 secondes, et est fortement prolongée suite à une exposition aux AVK, avec des valeurs médianes rapportées entre 40 sec (Sheafor and Couto, 1999) et 52,3 sec (Waddell et al., 2013). Une augmentation du TQ de 25% par rapport à un animal contrôle est considérée comme pathognomonique d'un défaut de coagulation. Chez les ruminants, quelques publications rapportent également des augmentations du TQ suite à une exposition aux AVK, chez les

bovins (Bullard et al., 1977), les moutons (Berny et al., 2006) et les chèvres (Martin et al., 1991). Etant donné que les valeurs de référence ne se trouvent pas facilement pour ces espèces et peuvent différer selon la technique analytique utilisée (Foley et al., 2014), l'utilisation d'animaux-contrôles est recommandée.

L'exploration des voies de coagulation est également utilisée pour diagnostiquer les intoxications aux AVK chez la faune sauvage, en particulier chez les oiseaux de proie (Hindmarch et al., 2019; Rattner et al., 2014b, 2012, 2011, 2010). Chez ces animaux, une augmentation du TQ de plus de 25% ou de 2 écart-types ou plus par rapport au TQ basal sont considérés comme révélateurs d'une exposition délétère aux AVK (Rattner et al., 2014b). Cependant, peu de valeurs de référence sont disponibles pour ces espèces, et une standardisation des méthodes de test serait nécessaire (Hindmarch et al., 2019). Une autre limite de l'usage du TQ chez les oiseaux est l'utilisation fortement recommandée d'une thromboplastine aviaire, peu disponible, pour déclencher efficacement la coagulation *in vitro*. L'utilisation de thromboplastine hétérologue (humaine, ou de mammifère : lapin, bovin) peut entraîner de très fortes variations du TQ (Doerr et al., 1975; Guddorf V, Kummerfeld N, Mischke R, 2014; Thomson et al., 2002). Pour compléter l'évaluation des voies de la coagulation chez ces espèces, le temps de venin de vipère Russel (RVVT) est fréquemment utilisé (Hindmarch et al., 2019; Rattner et al., 2020, 2012, 2010), avec l'augmentation concomitante du TQ « adapté » et du RVVT dans les 48 à 96 heures suivant l'exposition aux AVK (Rattner et al., 2012). Le venin de vipère de Russel sert à activer directement le facteur X de la voie commune de la cascade de coagulation, même en l'absence de facteurs IXa ou VIIa (Triplett and Harms, 1981d).

II.3.2.2.3. La vitamine K, un biomarqueur d'effet prometteur ?

L'enzyme VKORC1 étant en partie responsable du recyclage de la vitamine K, lors de blocage de l'activité VKOR, comme cela est le cas lors de l'intoxication aux rodenticides anticoagulants, on peut supposer que des variations interviennent dans les concentrations des différents vitamères de la vitamine K, avec possiblement une modification du rapport entre les formes oxydées et réduites de ces vitamères dans l'organisme (cf paragraphe II.1.3 pour plus de détails sur ce cofacteur et ses rôles physiologiques). Une relation dose-effet a été évoquée entre le ratio vitamine K1 oxydée/vitamine K1 réduite dans le plasma et les concentrations en 2 AVK, la phenprocoumone (un anticoagulant utilisé en thérapeutique humaine) et la warfarine (Schmidt et al., 1979). Il a également été proposé d'utiliser la mesure dans le sérum des formes époxyde et réduite de la vitamine K pour diagnostiquer les intoxications aux AVK chez le chien (Mount and Kass, 1989).

La détermination des concentrations en vitamères de la vitamine K est généralement réalisée par chromatographie liquide ou haute performance, qui peut être couplée à une détection par fluorescence (Waddell et al., 2013) ou spectrométrie de masse (Fourel et al., 2020, 2017; Sage et al., 2010; Thomas et al., 2011). Elle peut être effectuée sur du plasma, mais également en *post-mortem* sur différents tissus comme le foie ou les reins. Cependant, peu de données sont disponibles actuellement concernant la pertinence d'un tel marqueur dans le diagnostic des intoxications par les AVK, et plusieurs limites sont à prévoir : ainsi on peut s'attendre à ce que les taux basaux en vitamères soient différents selon les espèces considérées, voire selon la saison et la diète des animaux étudiés, ce dont il serait possible de s'affranchir en partie en utilisant des ratios (forme oxydée/forme réduite) plutôt que les concentrations brutes en différents vitamères. De plus, pour que ce marqueur soit également utile dans les investigations nécropsiques, ses concentrations doivent demeurer stables au cours du temps et en dépit de possibles variations de température ou de luminosité. Ainsi la vitamine K est possiblement un marqueur prometteur, mais des recherches sont nécessaires pour pouvoir mieux le caractériser et évaluer sa pertinence.

Article 1 :

Biomarkers Potency to Monitor Non-Target Fauna Poisoning by Anticoagulant Rodenticides

Antoine Rached¹, Meg-Anne Moriceau¹, Xavier Serfaty¹, Sebastien Lefebvre¹, Virginie Lattard^{1*}

1. USC 1233 RS2GP, VetAgro Sup, INRA, Univ Lyon, F-69280, Marcy l'Etoile, France.

*Correspondence author: Virginie Lattard, virginie.lattard@vetagro-sup.fr

Keywords: *biomarkers, rodenticides, primary exposure, secondary exposure, non-target, antivitamin K anticoagulant, toxicokinetics*

Citation : Rached, A., Moriceau, M.-A., Serfaty, X., Lefebvre, S., Lattard, V., 2020. Biomarkers potency to monitor non-target fauna poisoning by anticoagulant rodenticides. Front. Vet. Sci. 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.616276>



Biomarkers Potency to Monitor Non-target Fauna Poisoning by Anticoagulant Rodenticides

Antoine Rached, Meg-Anne Moriceau, Xavier Serfaty, Sebastien Lefebvre and Virginie Lattard*

USC 1233 RS2GR, VetAgro Sup, INRA, University of Lyon, Marcy l'Etoile, France

OPEN ACCESS

Edited by:
M. Ramiro Pastorinho,
University of Evora, Portugal

Reviewed by:
Shouta Nakayama,
Hokkaido University, Japan
Francisco Soler Rodriguez,
University of Extremadura, Spain

***Correspondence:**
Virginie Lattard
virginie.lattard@vetagro-sup.fr

Specialty section:
This article was submitted to
Veterinary Pharmacology and
Toxicology,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 11 October 2020
Accepted: 30 November 2020
Published: 23 December 2020

Citation:
Rached A, Moriceau M-A, Serfaty X,
Lefebvre S and Lattard V (2020)
Biomarkers Potency to Monitor
Non-target Fauna Poisoning by
Anticoagulant Rodenticides.
Front. Vet. Sci. 7:616276.
doi: 10.3389/fvets.2020.616276

The widespread use of pesticides to control agricultural pests is a hot topic on the public scene of environmental health. Selective pest control for minimum environmental impact is a major goal of the environmental toxicology field, notably to avoid unintended poisoning in different organisms. Anticoagulant rodenticides cause abnormal blood coagulation process; they have been widely used to control rodents, allowing inadvertent primary and secondary exposure in domestic animals and non-target predatory wildlife species through direct ingestion of rodenticide-containing bait or by consumption of poisoned prey. To report toxic effect, the most common approach is the measurement of liver or plasma residues of anticoagulant rodenticides in dead or intoxicated animals showing clinical symptoms. However, one major challenge is that literature currently lacks a hepatic or plasma concentration threshold value for the differentiation of exposure from toxicity. Regarding the variation in pharmacology properties of anticoagulant rodenticides inter- and intra-species, the dose-response relationship must be defined for each species to prejudge the relative risk of poisoning. Beyond that, biomarkers are a key solution widely used for ecological risk assessment of contaminants. Since anticoagulant rodenticides (AR) have toxic effects at the biochemical level, biomarkers can serve as indicators of toxic exposure. In this sense, toxicological knowledge of anticoagulant rodenticides within organisms is an important tool for defining sensitive, specific, and suitable biomarkers. In this review, we provide an overview of the toxicodynamic and toxicokinetic parameters of anticoagulant rodenticides in different animal species. We examine different types of biomarkers used to characterize and differentiate the exposure and toxic effects of anticoagulant rodenticide, showing the strengths and weaknesses of the assays. Finally, we describe possible new biomarkers and highlight their capabilities.

Keywords: biomarkers, rodenticides, primary exposure, secondary exposure, non-target, antivitamin K anticoagulant, toxicokinetics

INTRODUCTION

Pesticides are today the main means of pest control, making it possible to mitigate the economic, environmental and health consequences when pest population outbreak occurs (1). Nevertheless, legitimate environmental concerns relative to the use of all kind of pesticides (insecticides, herbicides, fungicides, rodenticides, fumigants) are growing. One of this concern involves their impact on non-target living species since more than 50 years already. A central question on this

topic is: "How to differentiate sub-toxic exposure to sublethal effects or lethal exposure?" (2–5). Indeed, in order to monitor the ecotoxicity of molecules and their effects on non-target wildlife and thus adapt pesticide use practices, it is necessary to clearly establish the causal link between the death of a non-target species or negative fitness effects on non-target species and pesticide exposure. Due to the diversity of non-target species, from small mammals to birds of prey, with for each species particular sensitivities or resistances to the pesticide in question, it is difficult to establish a level of exposure that may lead to the death. Nevertheless, for animal species, one powerful way to answer this question is through detection and/or quantification of biomolecules or compounds characteristic of a non-toxic or a toxic exposure, the so-called biomarkers, associated with clinical signs and near-environmental analysis. In this review, we will focus on summarizing current knowledge on biomarkers and associated parameters differentiation of sub-lethal exposure effects vs. lethal exposure for anticoagulant rodenticides (AR), that are also a hot topic of environmental concerns since decades (6–9).

More and more primary or secondary non-target intoxications with anticoagulant rodenticides are reported in the literature including mostly birds, especially raptors, but also a minor part of domestic animals such as cats, dogs and horses, and other wildlife species such as dears, polecats, martens, foxes, and very relevant literature reviews are already available on this topic (10–13). Few studies deal with determination of parameters of poisoning in different species (14) and the way to treat non-target poisoned animals is still relatively obscure while many questions on this topic still need answers, such as how long does the treatment should last, what is the frequency and the quantity of vitamin K needed as a function of the species or even based on the race (15). From this lack arise many questions about the follow up of AR and their impact on environment, notably: how to attribute the cause of death of an AR exposed animal? Considering the diversity of exposed species with specific susceptibility to AR and the diversity of AR molecules with different pharmacodynamic and pharmacokinetic parameters and the frequent detection of multiple contaminants for the same animal, the simple level of exposure of the animals seems to be insufficient to point at AR as sole responsible of the death. No literature review on the specific biomarkers of the sub-lethal or lethal exposure to anticoagulant rodenticides in non-target species is available until now. The aim of this review is to outline existing and propose new biomarkers, in order to allow a better follow-up of anticoagulant exposure and intoxication.

ANTICOAGULANT RODENTICIDES USE AND PROPERTIES

Importance of Anticoagulant Rodenticides Use and Animal Exposure

Use of Anticoagulant Rodenticides

Rodents control using anticoagulant rodenticides was introduced officially in 1948 (16), answering to the demand of authority, general population (17, 18) and mostly farmers and of all

the production and supply chains against tremendous damage caused by rodents all around the world, sometimes resulting in the loss of 100% of a production (19, 20). Anticoagulant rodenticides provide strong advantages among all chemical methods, e.g., they are slow acting compounds, they have a safe and very common antidote, the vitamin K, and they can be used at low concentration.

The risk of a pesticide used to control target species by causing their death is to select living target species that are less or not sensitive to this pesticide, the latter specimens are said "resistant." In 60's; the first resistant rodent population has been described (21). To deal with the emergence of resistant rodent populations resulting from the use of the first generation of anticoagulant rodenticides (FGAR) (warfarin, diphacinone, chlorophacinone) a second generation of anticoagulant rodenticides (SGAR) has been developed (22–24). Second generation molecules (bromadiolone, brodifacoum, dicoumarol, difenacoum, difethialone...) are more efficient against resistant rodents and effective at a lower dose. Despite these abilities, resistance to some SGARs has been reported in different areas due to massive use (25, 26). Currently this second generation is the most used in developed countries.

Anticoagulant rodenticides are included in baits of different types and forms (grains, pellets, solid blocks) depending on the application site and the targeted rodents (27). The presence of a carbohydrate source in bait formulation is important to ensure high palatability to attract rodents. Unfortunately, they are also palatable to other non-target species, even if a bittering agent is usually added to the bait. Besides the physical and chemical properties of bait formulations, its consumption depends on the affluence of traditional food sources that interest rodents (28–30). In European Union, rodenticide baits must be disposed in secured bait station since 2013. These bait stations are supposed to avoid primary exposure of non-target species by physically preventing the access to baits and their spread through water (27, 31, 32). However, their use by amateurs is not mandatory and non-target animals having similar size to target rodents can still access to the bait.

Animal Exposure to Anticoagulant Rodenticides

Primary and secondary exposure to anticoagulant rodenticides

There are two types of exposures to consider. Primary exposure occurs when a non-target animal directly eats the bait, while secondary exposure occurs when a predator ingests preys previously exposed to AR. Prevention is different for each case. Considering the primary exposure, the goal is to avoid the access to the bait by ensuring their correct storage and using them in secured bait station as previously discussed. Considering the prevention of the secondary exposure, the matter is more complex. Indeed, AR is a long-acting poison and targeted rodents may die within 2–6 days after ingestion. Moreover, rodenticides may influence gradually rodents' behavior. Actually, poisoned rodents become weakened with reduced appetite and motionless, lose their nocturnal disposition and positive thigmotactic

behavior; they are therefore more prone to predation (33–35). Thus, to mitigate secondary exposure, AR have to be less persistent in the target animal body.

Domestic animal exposure to anticoagulant rodenticides

In domestic animals, the majority of exposures are primary ones. They are often the consequences of a misuse or an improper storage of baits allowing domestic animals to access to AR. According to a French veterinary poison control center (CNITV), AR exposures represent 10% of the total call to the center and dogs accounted for 82.8% of AR exposure incidents, followed by cats with <10% (36). The pet exposures are mainly accidental. Indeed, the few studies that assess the exposure of healthy dogs without AR intake mentioned by the owner show that they are not chronically exposed to AR. Indeed, <2% of dogs are positive to AR (37, 38). Cats would be more prone to secondary exposure to AR. However, to the knowledge of the authors only primary exposure cases have been observed and studied in cats (36, 39). For pets the incidence of exposure seems to be seasonal, with an increase at the beginning of autumn (36, 39). Considering livestock, the primary exposure is mainly due to an improper storage of baits that makes them reachable. The incidence of these exposures seems to be low compared to pets (<2.2% of AR exposure cases) (36). Nevertheless, livestock exposures raise public health concerns discussed below.

Since the majority of AR exposures are accidental, owners notice the event and treatment is administered before symptoms occur. According to the CNITV data, SGAR are reported in more than 60% of exposure cases (in 22%, the AR molecules are not identified) (36). This incidence is due to the highest efficiency of SGAR compared to FGAR, that are now less used. Moreover, the number of cases started to decrease after 2013 with the regulatory obligation to use bait station.

Livestock can also be exposed and intoxicated to natural anti-vitamin K like dicoumarol after the ingestion of moldy clover fodder (40, 41) or like ferprenin and ferulenol after giant fennel intake (42, 43).

Wildlife exposure to anticoagulant rodenticides

Depending on their size and dietary regimen, wild animals can be primary or secondary exposed to AR. The mandatory use of secured bait stations for the application of AR during a biocidal use may decrease the primary exposure of mammals larger than rats although some large mammals like wild boars seem to be highly primary exposed to AR (60%) in suburban area (44). However, small rodents can still access to baits. Thus, in the 20 meters perimeter around bait boxes, about 50% of non-target small mammals can be exposed to AR (45). This exposure affects all *taxa* and decreases with the distance to the bait boxes (45, 46). The small mammal exposure is a concern for both small-mammal populations themselves (notably for endangered species) but also for their predators.

Predators can be secondary exposed to AR from target and non-target species, according to their diet (47). The exposure of birds of prey, foxes, racoon dog, marten, bobcat, or polecat varies from 20 to up to 90% (48–53). This prevalence is strongly linked to the proximity of an area of human activity such as urban

areas or farms (51, 54, 55). Similar to domestic animals, wildlife predators are exposed mostly to SGAR. SGAR are composed of asymmetric molecules called stereoisomers, but predators like red foxes are more exposed to some stereoisomers than others (56). While predator exposure to AR is high, it is more rarely linked to their death (57–60). However, it raises many questions about the consequences of this chronic exposure on the wildlife. Some mitigation risk measures to protect predator fauna have been tried as the removal of dead rodents (61). However, new approaches are needed to mitigate efficiently the secondary exposure of predators. The design of new “eco-friendly” SGAR, based on the different properties of AR stereoisomers, might be interesting and is discussed below (62). Finally, some mammals and birds might also be exposed by eating invertebrates that would have entered the bait box (63).

Anticoagulant Rodenticides Properties General Mechanism of Action of Anticoagulant Rodenticides

Vitamin K in its hydroquinone form (VitK_{HQ}) is a cofactor of Gamma-Glutamyl Carboxylase (GGCX) enzyme that performs a gamma-carboxylation of glutamate residue of some proteins called vitamin K dependent proteins (VKDP). VKDP have to go through this post-translational gamma-carboxylation to be able to chelate calcium and activate their physiological properties (64–67). During the reaction, VitK_{HQ} is oxidized and oxygenated into vitamin K epoxide (VitK_{OX}). Since dietary intake is often insufficient to meet the vitamin K need (66), VitK_{OX} has to be recycled in VitK_{HQ} to maintain the gamma-carboxylase activity. The recycling is performed by the vitamin K epoxide reductase enzyme (VKORC1) and it takes place in two stages (Figure 1): (1) a deoxygenation of VitK_{OX} catalyzed by the Vitamin K Epoxide Reductase (VKOR) enzyme leading to the formation of Vitamin K Quinone (VitK_Q) and (2) a bielectronic reduction of VitK_Q in VitK_{HQ} mostly catalyzed by the VKORC1 enzyme and as an alternative minor pathway by the consensual NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) enzyme that is not the sole alternative reduction path (69–71).

Anticoagulant rodenticides are inhibitors of VKORC1 (72). When their concentration reaches a sufficient threshold, vitamin K recycling is stopped. Four clotting factors, the factor II, VII, IX, and X, synthesized by the liver, are among the VKDP. Consequently, under the effect of AR, these vitamin K dependent clotting factors are no longer activated by gamma-carboxylation and the blood concentrations of active clotting factors decrease leading to delayed uncontrol bleeding and sometimes death (64–67). This delay in action prevents the rodent to associate the effects with the ingestion of baits and explains the efficiency of these rodenticides. Moreover, in case of accidental exposure, the delay of action eases the implementation of a treatment.

SGAR molecules are little more potent than FGAR ones to inhibit VKORC1 of susceptible rat (73). Nevertheless, SGAR are more than 10 times more efficient than FGAR on resistant rodents (73). This potency to inhibit recycling mechanism of resistant rodent is one aspect of the effectiveness of SGAR. Moreover, it seems that this characteristic is shared among stereoisomers of a same molecule (74).

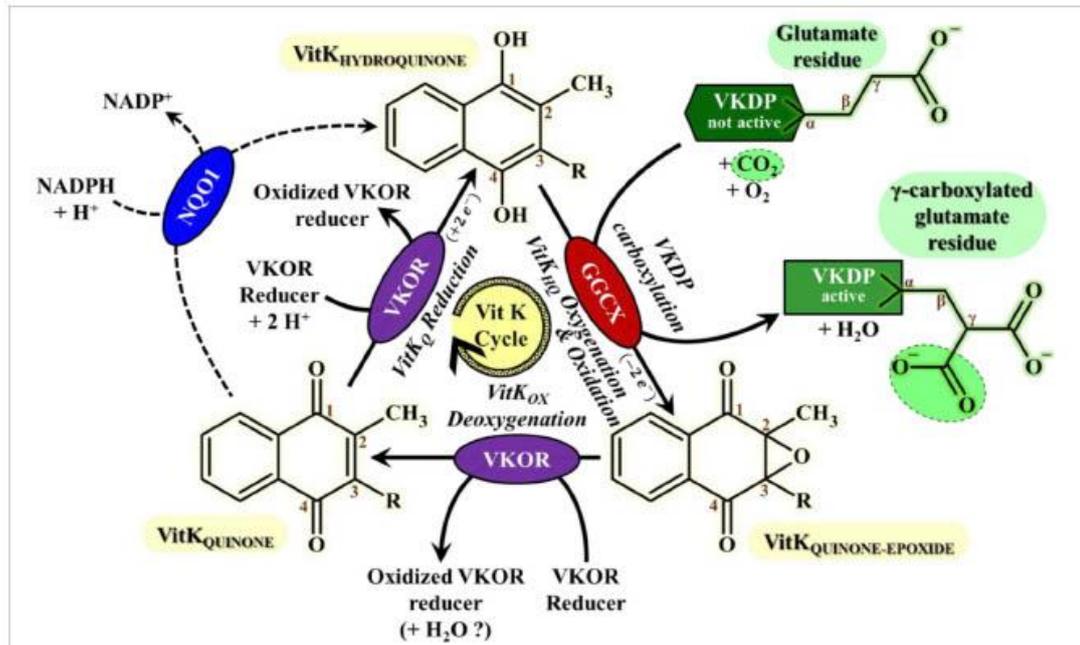


FIGURE 1 | Vitamin K cycle most important features for VKAs mode of action understanding. This cycle consists in the recycling of vitamin K-Hydroquinone (VitK_{HQ}) state, the sole active Vitamin K redox-state involved in the carboxylation mechanism of VKDPs catalyzed by the GGCCX enzymes. The recycling of VitK_{HQ} needs the deoxygenation of Vitamin K Quinone-Epoxyde state (VitK_{OX}) only catalyzed by VKOR enzymes, followed by bioelectronic reduction of Vitamin K Quinone state (VitK_Q) mainly catalyzed by VKOR enzymes and by an alternative enzyme which current consensus is NQO1 (68). Gamma-Carboxylation of glutamate residues from Vitamin K Dependent proteins (VKDP) catalyzed by GGCCX is required for activation of VKDPs proteins, including essential clotting factors. The regeneration of the reduction power of VKOR is sustained by a "VKOR reducer" that is much likely, as far as we know, a protein partner probably from PDI-like enzymes family. VKOR stands for VKORC1 or VKORC1L1; GGCCX, Gamma-Glutamyl Carboxylase; NQO1, NADPH:Quinone Oxidoreductase 1; VKDP, Vitamin K-Dependent Protein; VitK_{HQ}, Vitamin K Hydroquinone form; VitK_{OX}, Vitamin K quinone-epoxide form.

While vitamin K dependent clotting factors are the main VKDP affected by an AR exposure, long-term exposure may affect other VKDP like osteocalcin (OC) or matrix Gla protein (MGP). These proteins are involved in bone formation and energetic metabolism for osteocalcin (75, 76) and in the protection of soft tissue calcification for MGP (77).

General Pharmacokinetic Properties of Anticoagulant Rodenticides

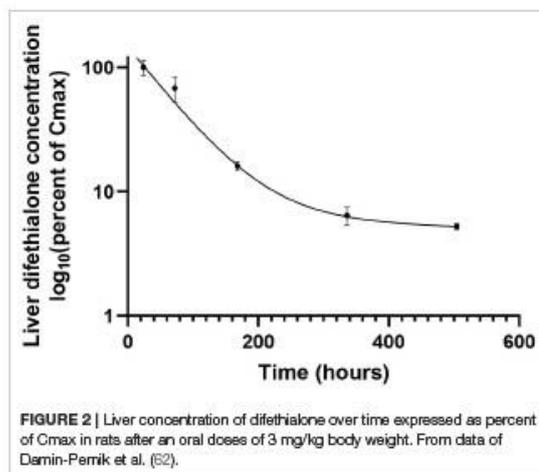
AR molecules are rapidly and efficiently absorbed after ingestion (78). Moreover, some molecules can also go through the cutaneous barrier (79–81). The distribution of AR molecules through the organism differ widely between FGAR and SGAR. SGAR molecules are more liposoluble than FGAR and distribute more largely in hepatic tissue than other tissues like kidney and circulate slightly and transiently in plasma (82, 83). Conversely, while they are also found in liver, a significant amount of FGAR molecule circulates through the blood (78, 83). In addition, AR molecules can be excreted in milk and egg (84, 85). After an oral intake, the maximum liver concentration of the majority of AR molecule is reached in 4–8 h (66, 83, 86).

TABLE 1 | Eliminated half-life for anticoagulant rodenticides in rat and mouse.

Generation	Compound	Hepatic half-life (days)	
		Rat	Mouse
1st generation	Chlorophacinone	35	35.4
	Diphacinone	3	–
	Coumatetralyl	55–62	15.8
	Warfarin	26.2–67	66.8
2nd generation	Brodifacoum	113.5–350	307.4
	Bromadiolone	170–318	28.1
	Difethialone	74–126	28.5
	Flocoumafen	215	93.8
	Difenacoum	118–128	61.8

Modified from: (87–92).

Table 1 presents hepatic half-lives of different AR molecules. Nevertheless, these data are to be taken with care. Indeed, these half-lives have been measured after a very low exposure and with a monitoring of only some weeks while half-lives reported



are for some molecules of more than 100 days. Moreover, these results are inconsistent with other pharmacokinetic studies that report half-lives in hours (62). These discrepancies can be explained by a bi-phasic elimination with an initial- and a terminal-half-life. Figure 2 shows the hepatic pharmacokinetic of difethialone in rats. During the first decay phase the initial half-life is of 44 h while during the terminal phase the half-life is of 74 days like previous reported data in the table. However, when slow decay begins 95% of liver difethialone has been yet eliminated. Thus, final half-lives have to be interpreted with care. Nevertheless, the difference between the first and the second generation is clear and well-known, SGAR are more persistent than FGAR. This persistence explains, in part, the efficiency of SGAR. Indeed, while the baits including FGAR require several ingestions over several days to be effective, baits including SGAR require theoretically only one ingestion. Nevertheless, this advantage is also certainly responsible for SGAR high exposure and bioaccumulation in non-target species.

As presented above, all stereoisomers of SGAR are not found in exposed non-target animals (56). This observation can be explained by the different persistence between stereoisomers. Indeed, while some stereoisomers are still quantified for many days after a lethal exposure to SGAR, others are not because they have a very short hepatic half-life (62, 74, 93). For example, the four stereoisomers of difethialone have initial half-life of, respectively, 6, 25.4, 69.3, and 82.3 h (74). Thus, only the last two stereoisomers contribute to the secondary exposure of non-target species.

AR are metabolized through cytochrome P450. Cytochromes involved in the AR degradation are different according to the nature of the molecule and its stereochemistry (94). These specific pathways for each stereoisomer could be the source of their different half-lives (95). If a part of some FGAR can be eliminated through urine (96, 97); the majority of AR are mainly or exclusively eliminated through feces (86, 87, 98, 99).

Idiosyncratic Susceptibility of Individuals to Anticoagulant Rodenticides

Not all individuals respond equally to exposure to AR. According to their species, sex or genetic, animals will be more or less susceptible to AR. Table 2 presents LD₅₀ of some AR according to the species exposed. This table pinpoints the wide discrepancy between species considering AR susceptibility. Moreover, some species are more susceptible to some molecules without a correlation with their generation. For instance, pigs tolerate difethialone more than brodifacoum or warfarin (106). In this part, we focus on the reasons of these differences.

Variations of Susceptibility to Anticoagulant Rodenticides Related to Pharmacodynamics

A large part of the differences of susceptibility to AR might be explained by a difference of VKORC1 sequence among species. Figure 3 shows a multiple sequences alignment of the VKORC1 amino acids. While the active site is well-conserved between species, there are multiple changes among other parts of the protein. The sequence identity (conserved amino acids) between the 15 sequences presented is only of 60% and their homology (conserved amino acids and amino acids with similar chemical properties) is of 83%. The change of only one amino acid may induce a major resistance to AR of the VKORC1 enzyme. Indeed, VKORC1 amino acid changes have been demonstrated to be involved in the difference of susceptibilities among same species, as described in mice, rat and human (23, 73, 107, 108) and the intensive use of AR has selected the most resistant variants of VKORC1 among rodent populations (23, 73). However, this difference of susceptibility to AR differs according to the mutation and to the AR considered (73). For many species, VKORC1 polymorphisms and their consequences on the susceptibility to AR are unknown.

Another possible source that may explain differences in sensitivity is the vitamin K dependent clotting factors pool and its rate of decrease after the inhibition of VKORC1 by AR. This mechanism is proved in the difference of susceptibility between female and male rats (66). Indeed, females have higher basal pool of factor VII and the decrease of plasmatic factor II and factor X are slower than males. Moreover, there is a lag time of 4 h before factor VII begins to decline in females. Thus, female rat coagulation is slower impaired by AR than male one (66). The difference of susceptibility according to the sex differs among species. For instance, female mice resist less to AR than males.

Finally, food could be a pathway of resistance. Indeed, a vitamin K rich diet might reduce the action and the efficiency of AR exposure by providing the antidotes to the animals. However, this kind of resistance has not been clearly demonstrated or identified in wildlife populations (109, 110).

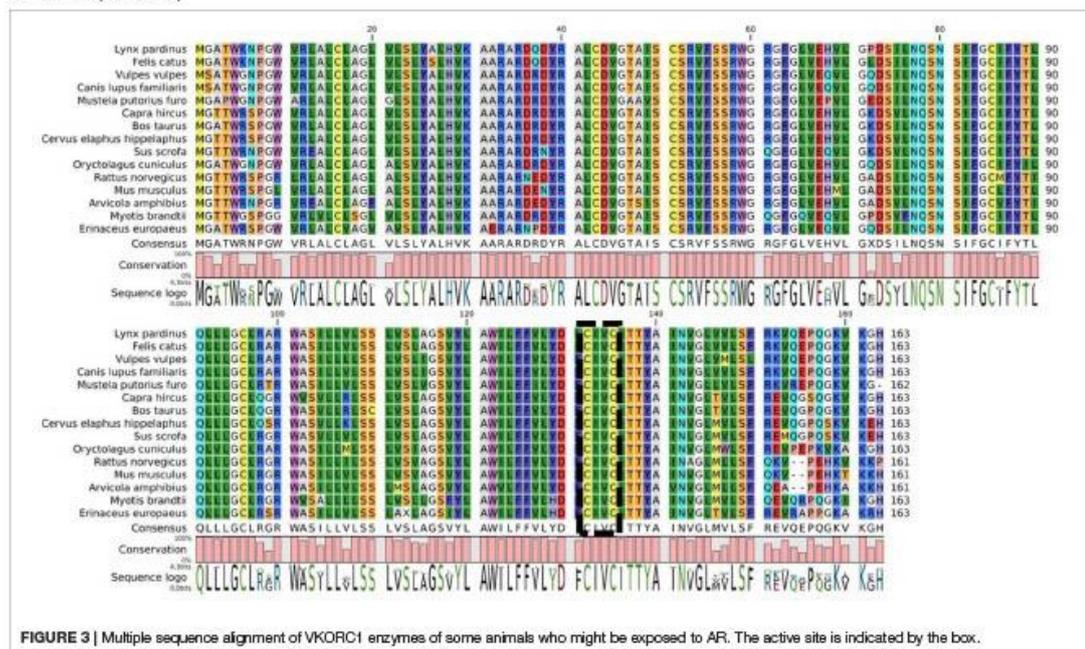
Variations of Susceptibility to Anticoagulant Rodenticides Related to Pharmacokinetics

Pharmacokinetics may be another source of susceptibility or resistance to AR. As discussed previously, the hepatic half-lives of rodenticides differ widely between rats and mice. Moreover, there is no general rule to convert rat half-life to mice one, pharmacokinetic parameters should be determined

TABLE 2 | Single-dose oral LD50 (mg/kg body weight) in different animals.

	Chlorophacinone	Diphacinone	Difenacoum	Brodifacoum	Difethialone	Bromadiolone
Rat	2–20.5	0.3–30	1.8	0.27–0.5	0.58	0.58–1.12
Mouse	1–20.5	141–340	0.8	0.4	1.29	0.99–1.75
Guinea pig	–	–	50	0.28	–	2.8
Rabbit	50	35	2	0.2–0.3	5.3	1
Dog	–	0.88–15	50	0.25–1.0	4	8.1–10
Cat	–	5–15	100	0.25–25	–	25
Pig	–	150	80	10	2–3	3
Chicken	–	–	50	3.15–20	–	5
Sheep	–	–	100	10	–	–
Mallard duck	100	3,158	2	4.6	–	–
Wild birds	430	–	–	–	–	–
Quails	–	–	–	–	–	1,800

Modified from: (10, 100–105).



for each pair molecule-specie. Moreover, some bird species like *Gallus domesticus* showed greater metabolic activity of warfarin compared to rat whereas very little warfarin metabolism was demonstrated in owls which can explain the recurrence of reported poisoning in these species (111). In addition, compared to red deer and pigs, cattle has different pattern of distribution and metabolization of diphacinone with rapid initial phase of decline and longer terminal hepatic half-life suggesting a more developed binding of diphacinone in the liver of cattle or advanced enterohepatic circulation (112). More generally, since expression of cytochrome P450 and xenobiotic metabolism

pathways differ among species (113), it is not possible to generalize the elimination rate of AR for all species. This elimination rate defines the persistence of the molecule in non-target species and therefore its ability to bioaccumulate.

Among a same species, some lines of animals have a better metabolism of AR that may lead them to resist to some rodenticides. It is the case of a line of roof rat (*Rattus rattus*) (114) in Japan, of the Berkshire line of brown rats (*Rattus norvegicus*) (115) and of a population of California ground squirrels (*Otospermophilus beecheyi*) (116). The overexpression of P450 cytochromes involved in AR metabolism was often

undefined or suspected. As these expressions are also sex dependent, it could be linked to the AR susceptibility difference between male and female. Indeed, in many species P450 cytochromes are overexpressed in female (116, 117). Despite that pharmacokinetics are not always associated with susceptibility or resistance, in Lefebvre et al. (66) liver difethialone area under the curve and maximum concentration are almost twice higher in female rats than males, yet females are less susceptible than males.

Anticoagulant Rodenticides Exposure, When to Suspect It?

Considering the extent of AR exposure in domestic and wildlife fauna, it is essential to monitor it. The first clues of an animal exposure are clinical signs suggesting of an acute exposure. However, the consequences of chronic exposure, even if less known, as well as animals that are asymptomatic but at a high risk of exposure must also be considered in AR exposure monitoring.

Acute Clinical Signs That Are Suggestive but Not Specific

Clinical signs of rodenticide intoxication are quite similar for higher vertebrate species: hemorrhagic syndrome, with main localizations being respiratory (coughing/hemoptysis, nasal bleeding, pulmonary oedema, intrapulmonary, and pleural hemorrhages) and digestive (hematemesis, hematochezia, and melena) tracts, and less specific symptoms including lethargy, anorexia, pallor or ataxia, that are usually the first signs to be noticed (118–122). Clinical onset is usually delayed from 2 to 10 days post-ingestion (36, 121).

Numerous case reports in dogs provide extensive descriptions of the clinical signs observed. Apart from general and non-specific signs, and respiratory and digestive bleeding disorders, tachycardia and dyspnea with polypnea are reported, as well petechiae and echymoses on the skin and mucosa, and pallor (11, 119). Some reports mention also subconjunctival hemorrhages (123). At a later stage of the intoxication (after 1 week), a bilateral symmetrical enlargement of the abdomen can also be observed in certain cases, frequently accompanied by prolapse of the ventral abdominal wall and lordosis of the vertebral column, resulting from hemorrhagic effusion (ascites). The formation of massive hematomas after venipuncture is also quite characteristic (11).

Ruminants are apparently less often exposed than other domestic species (only 2.2% of calls to the CNITV about rodenticide poisoning are for ruminants), and display clinical signs less frequently (only 10.5% of exposed animals displaying clinical signs according to CNITV data—without further details on the severity of those signs) (36). Case reports in ruminants (cattle, sheep) mention that overt clinical signs of intoxication are usually absent (85, 124), with only a slight increase of bleeding time at the venipuncture site in some cases (125). This decreased incidence of clinical signs is possibly due to a lower sensitivity to AR, that could be related to a dilution effect in the rumen, endogenous production of vitamin K1 in the rumen, or dietary vitamin K in their feed composed of leafy greens (85, 125). Still, AR intoxication might be more severe in young animals, as one case report mentions fatal hemorrhages in lambs following

exposure to chlorophacinone (126). Reports on horses are less frequent, but still some cases of AR intoxication are described, with similar symptoms to other species (127, 128). In one case, AR toxicosis is suspected to have led to the abortion of the mare (129).

AR toxicosis in wild animals, especially birds of prey, is also quite well-described in literature. Similar signs are reported, observed ante- or post-mortem, with a great focus on overt hemorrhagic lesions (e.g., bruising, bleeding from orifices, hemorrhages of cavities, and gastro-intestinal tract) (130, 131). In some cases, there might be no frank evidence of bleeding, and microscopic hemorrhages in tissues (heart, liver, kidney, lung, intestine, skeletal muscle) should be sought by histological examination to confirm diagnosis (132).

In laboratory rats, transient early hemoglobinuria (associated with oxidative stress) with consecutive late hematuria (associated with anticoagulation) were observed after poisoning with brodifacoum, that could be used as novel clinical biomarkers of AR poisoning, if generalizable to other species (133). Moreover, in human treated with warfarin soft vascular calcification may occur (134). This adverse effect of anti-vitamin K anticoagulant has been confirmed in rat model (135). Nevertheless, to the knowledge of the authors, such calcifications have not been suited in AR exposed fauna but would deserve to be studied.

Thus, hemorrhage are important markers of acute AR toxicity in higher vertebrate species. Moreover, they can be used in both alive and dead animals. Nevertheless, hemorrhages are not specific of AR intoxication, as they might be the consequence of trauma (consecutive to AR intoxication or not) or diseases like leptospirosis (136) or other causes of bleeding. Thus, if the presence of hemorrhages is an important clue in favor of AR poisoning, it is not sufficient to conclude.

When hemorrhages occur in living animals, the therapeutic response to vitamin K injection may allow to reinforce or reject an AR intoxication hypothesis. However, false positive occurs in the case of vitamin K deficiency (due to an unbalance diet) or of genetic VKORC1 activity deficiency (137). However, in the case of an exposure of a large and/or wild animal the cost of the treatment may raise the question of its necessity. Is the exposure sufficient to threaten the animal health and when should we stop the treatment? Indeed, because of the persistence of SGAR, treatment lasts at least 5 or 6 weeks, and in human medicine its courses averaged 168 days, is it sufficient or too long? The current method to set the duration of treatment is, to stop it after 1 month of treatment for 48 h then to assess the prothrombin time (PT) (36). Is there a biomarker that can predict if the treatment is necessary and when to stop it without discontinuing the treatment?

Clinical Signs Suggestive of a Chronic Exposure to Anticoagulant Rodenticides

Clinical signs of a chronic exposure are currently not sufficiently characterized to be used to suspect an AR exposure at the individual scale. More and more studies suggest that the effects of AR are not confined to coagulation alone. Indeed, the activity of VKDP unrelated to coagulation may also be impacted by AR. More precisely the bone metabolism may be influenced by the decrease of osteocalcin carboxylation and vascular

calcification prevention by that of MGP. Decrease in bone density and increased risk of fractures (by under-carboxylation of osteocalcin), have been investigated in AR-exposed predatory birds, without any conclusive result (138). However, studies based on rodent model show teratogenic activities of some AR with consequences on bone formations (139, 140). Conversely, the relationship between chronic exposure to warfarin and valvular and coronary calcification has been widely described in human (as part of anticoagulant treatment) and in rodent model (135, 141). To the author knowledge vascular calcification have not been studied in exposed wildlife population.

Beyond effect related to VKDP, AR are suspected to increase susceptibility of bobcats (*Lynx rufus*) to notoedric mange, with some fatal outcomes, by interfering with the immune system of the exposed animals (142, 142). The effect of AR on immunity has been confirmed in rats and on human cells (81, 143, 144). Another studies show that chronic exposure could have an effect on genetic expression of bobcat (145). In addition, as described in rodent, AR might be a source of behavior modification (33–35). Thus, the consequences of chronic exposure on the health of non-target animals could be very diverse and should be better studied. Indeed, with this lack of characterization it may be difficult to distinguish the effect of AR and non-AR molecules in the case of multiple contaminations.

As the clinical signs of a chronic exposure are not well-established, AR exposure should be suspected at animal population level. The sign of appeal might be, bone deformation or abnormalities (notably in new-born), unusual infectious susceptibility for no obvious reason (immunodeficiency virus...) and vascular calcification at necropsy. Moreover, chronic exposure with only slight clinical signs may not be identified, the criteria for suspicion of asymptomatic exposure are also relevant.

Asymptomatic Exposure to Anticoagulant Rodenticides

Due to the difference of susceptibilities of animal species to AR, to the level of exposure or to the delay after exposure (few hours to few days), some animals may not present any clinical sign whereas they have been exposed to AR. If it is not a problem for the animal itself, it can be, depending on the situation, for other individuals, for animals in the food chain or even for humans. This animal can be a source for secondary AR exposure. Indeed, this animal or its products can be consumed.

In the case of domestic animals, as exposures are mainly primary and occurs in a controlled environment, asymptomatic exposure to AR is suspected when animals were able to get access to the bait. There are few studies on the risk of the consumption of products from exposed animal. However, as AR can be excreted in milk and eggs (84, 85), it is advisable to withdraw these products from human and animal consumption and to contact a veterinary poison control center.

Considering wildlife, it is more complicated as it is not possible to suspect if the animals have been exposed (no controlled environment). It is an issue for the wildlife, as exposed animal can be a source of secondary exposure for predator. Thus, it is a major concern for hunted species like wild boar which can be a source of human exposure. According to the exposure

studies on small mammals, predators and wild boar, wild animals should be suspected of being exposed when they are found close to areas with significant human activity (urban area, farms...) (44, 46, 49, 51). Moreover, in some countries, they can be both a pest (and treated with AR) and a food source (146). This makes it necessary to provide pedagogical support to the population and a risk-benefit approach to the use of AR.

In the presence or absence of clinical signs, a suspicion of exposure to AR should be confirmed and its biological consequences assessed, in order to measure the impact of these molecules on non-target species. This monitoring will make it possible to measure the effectiveness and relevance of new practices and methods for controlling rodent populations with a view to reducing the exposure of non-target populations.

BIOMARKERS FOR ANTICOAGULANT RODENTICIDES EXPOSURE ASSESSMENT

Definition and Efficiency Criteria

Biomarkers are measurable parameters at biochemical, histological, immunological, physiological, or organismic levels, that are used as indicators of certain biological states or conditions (147). They are relevant in many scientific fields, especially in ecotoxicology, but also in the biomedical field.

In the field of ecotoxicology, there is a constant need to detect and assess the impact of pollution, particularly in cases of low concentrations of increasingly complex mixtures of contaminants. This has led to an increasing number of studies on the development of indicators of the biological effects of contaminants on organisms.

A common dichotomy for biomarkers in ecotoxicology is between biomarkers of exposure, and biomarkers of effect. While biomarkers of exposure are relevant for hazard identification (e.g., for xenobiotics, identification of the parent compound, or derived metabolites), biomarkers of effect are used for hazard assessment, as they assess the response of the exposed organism to the particular xenobiotic or complex mixture (147). A third category would be biomarkers of susceptibility, used for indicating the inherent or acquired ability of an organism to respond to the challenge of exposure to a specific xenobiotic substance.

Biomarkers are sought at different levels of the organisms (148, 149). They may be inducible enzymes playing a role in the xenobiotics elimination (i.e., phase I biotransformation enzymes—such as isoforms of cytochrome P450—and phase II enzymes such as glutathion-S-transferase), but also oxidative stress parameters, biotransformation products (e.g., metabolites levels in body fluids), stress proteins (heat-shock proteins), hematological parameters (e.g., delta-aminolevulinic acid dehydratase—ALAD—as a biomarker applicable to lead exposure), immunological parameters, reproductive and endocrine parameters, neuromuscular parameters (e.g., acetyl cholinesterase inhibition by organophosphorus and carbamate agricultural pesticides), genotoxic parameters (e.g., DNA adducts), physiological and morphological parameters (e.g., asymmetric development, organ size variations), or even

proteomics and genomics, which provide an integrated picture of the way an organism responds to a changing environment (150).

It is worth noting that misapplication or misinterpretation of biomarkers in ecotoxicology may lead to erroneous conclusions. The first potential biases arise from handling conditions of samples, including their collection and storage that might affect the final quantitative and qualitative assessment of the biomarker. Sample relevance may decrease due to biological (decomposition process including other living organisms) and physicochemical (oxidation, denaturation, hydrolysis...) factors that cause potential instability of the biomarkers. In general, ante-mortem samples are better processed because they are taken fresh from a live animal. This does not apply to those taken from animals found in the wild without knowing the time of their death therefore ignoring the post-mortem interval before their collection. Carcasses should ideally be collected upon animal death and specimens should be fixed in liquid nitrogen transported and stored at -80°C to ensure biomarker preservation. For an accurate interpretation of circumstantial changes, a thorough understanding of the post-mortem process of the biomarker in different organs regarding to its constancy over time and environmental factors (temperature, photoperiod, etc.) is necessary.

Interspecies extrapolation is not always possible, as well as translation from the laboratory to the field situation, and the impact of non-pollution-related variables (health condition, gender, age, nutritional status, metabolic activity, migratory behavior, reproductive and developmental status, population density, season, ambient temperature, heterogeneity of environmental pollution) should be considered as confounding factors (148). The relevance of the use of biomarkers is therefore sometimes questioned (151), as they may be useful as indicators of exposure and for the formulation of hypothesis in carefully controlled experiments, but might not be expected to provide useful predictions of relevant ecological effects, which does not meet the aims of environmental monitoring and ecological risk assessment to detect and/or predict adverse chemical effects on populations, communities, and ecosystems. Still, those markers may be relevant for long-lived species, or rarer species, for which non-invasive indicators are needed.

For non-target fauna poisonings by anticoagulant rodenticides (AR), while clinical biomarkers are relevant for the identification of individual poisonings in domestic and wild animals, ecotoxicological biomarkers are needed to assess the extent of exposure to AR and the sublethal effects of these contaminants on wildlife populations. Based on the criteria that have been defined to identify relevant biomarkers in the environmental risk assessment (ERA) for chemicals (149), we propose seven criteria for assessing the relevance and condition of use of AR biomarkers:

- Development stage: is the biomarker only an idea, or used for research purposes or sufficiently standardized to be used on the field?
- Dead or alive: does the biomarker is usable for a dead animal, a living animal or both?
- The availability of usual values or thresholds for the considered species.

- Compatibility with treatment with vitamin K: can biomarker be used to assess AR exposure or potential effects during treatment?
- Sensitivity: does biomarker can detect limited exposure to AR or confirm a symptomatic exposure?
- Specificity: are there confounding factors for the biomarker?
- The toxicological significance of the biomarker (relationship between response and impact to the organism) must be demonstrated.

Table 3 gathers and assesses the main biomarkers identified in this review according to previous criteria.

Exposure Biomarkers: the Concentrations of Anticoagulant Rodenticides Molecules

Non-invasive detection and quantification of AR can be performed in plasma (85, 152–155), milk (85, 124), and feces (37, 154, 156, 157), while invasive analysis can also detect AR in target organs, especially in the liver, that is widely used for forensics investigation especially for wildlife (61, 130, 131, 158–160), but also in muscle, fat, or bone (155). Analyses are usually performed by high performance liquid chromatography that can be coupled with UV, fluorescence (152) or mass spectrometry (157, 160–162) detection.

AR screenings can be relevant to confirm and quantify exposure to these chemicals. For domestic animals, it can be a valuable tool for confirming the diagnosis of AR intoxication in cases where ingestion has not been observed, (152) but it is not always really relevant, as blood parameters are quite sufficient to determine the need of treatment, and as it is not a possible routine exam in clinical settings. Furthermore, severity of clinical signs or extent of PT prolongation do not seem to be correlated to AR concentration in dogs (152) or sheep (85).

As feces are the main route of AR elimination, their use to monitor exposure to AR has been widely investigated, both for domestic species (e.g., sheep, dogs) (154, 155) and wildlife, with investigations on foxes (157, 163). Further research is still needed on the elimination pattern for each AR, to accurately monitor exposure to those products, and some limits for this method to be used on the field is that AR are not stable in feces when outdoor, so only fresh samples (<5 days) should be used for monitoring (163). Moreover, plasma and fecal levels of AR are not correlated with liver levels (37, 154, 164). Some AR such as bromadiolone circulate poorly in the blood. Thus, the assessment of exposure through plasma or fecal material may lead to false negative results or underestimated exposure.

Investigations on AR levels in the liver of necropsied birds of preys have been widely conducted, with the purpose to determine a threshold that could allow to differentiate between simple environmental exposure and real intoxication on those animals, and thus to better assess the ecological impact of AR on the wildlife population. A repeatedly cited toxicity threshold is above 100–200 ng/g wet weight (165), but was determined rather as a potential lethal range, and derived from a single species, the barn owl (*Tyto alba*). More recent research has been conducted by combining both published data and results from surveillance programs in Canada and using logistic regression

TABLE 3 | Biomarker assessing the exposure and the effect of anticoagulant rodenticides in animals.

Biomarker	Tissue	What is dosed	Dosing methods	Development stage (experimental, research, available)	Dead or alive	Stability of sample over time	Available usual value	Compatibility with treatment	Sensitivity	Specificity	Toxicological significance
AR dosing	Liver (organs)	Levels of AR in the tissue—detection can be stereoisomer-specific	Usually LC-MS/MS	Available	Dead (or through biopsy)	Really stable	NA	Yes	High	High	Proposed threshold for birds of prey, to be further investigated
	Plasma				Alive		NA	Yes	Low	High	No
	Feces				Alive or freshly dead	Quick decrease over time when exposed to weathering	NA	Yes	Low	High	No
Prothrombin time	Plasma on citrated tube	Ratio based on coagulation time of a citrated plasma, without platelets, with calcium and thromboplastin	PT assay	Available	Alive	NA	Available for domestic animals	No	Medium	Medium	High in acute exposure
Vitamin K dependent clotting factors	Plasma on citrated tube	Activity of clotting factor	Chromogenic assay	Research	Alive	NA	No in animals	No	Medium	High	High in acute exposure
ucOC	Plasma	Undercarboxylated osteocalcin as the percent of the total osteocalcin in the sample	Radioimmunoassay (RIA) or ELISA	Experimental	Alive	NA	NA	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
ucMGP	Plasma and some tissues	Undercarboxylated, inactive species of MGP	Radioimmunoassay (RIA) or ELISA	Experimental	Both depending on the tissue considered	NA	NA	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
VKOR activity from liver extract	Liver	Ability to produce vitamin K quinone from epoxide form	Enzymatic assay	Research	Dead	Has to be immediately store at -80°C	NA	NA	NA	NA	Assess one mechanism of resistance
VKOR activity from VKORC1 sequences expressed in yeast or cell	DNA sample or VKORC1 sequences	Enzymatic assay : Ability to produce vitamin K quinone from epoxide form	Enzymatic or cell assay	Research	Alive	Long	NA	NA	NA	NA	Assess one mechanism of resistance
Vitamin quantification	Liver, kidney or lung	Vitamin K1, and MK-4, in quinone and epoxide forms	HPLC-fluorescence	Experimental	Dead	Fairly stable at room temperature	Epoxide forms are absent in healthy animal	Yes	Unknown	Quite high (author data)	High in acute exposure, unknown in chronic exposure

NA, not available.

to estimate the probability of toxicosis associated with different liver AR residues. It described a significant likelihood of toxicosis in 5% of individuals with liver concentrations of 20 ng/g wet weight and in 20% of individuals with concentrations of 80 ng/g wet weight (160). Still, one of the limitations pointed out in the study, as well as in some other publications (159), is the species-specific sensitivity that prevents any extrapolation of a potential threshold, especially as a discrepancy exists between birds tested in captivity which might be more tolerant to AR than free-ranging birds with more complex daily activities and environmental stressors. Some authors thus consider that such a parameter may not be a relevant diagnostic tool, as it is neither accounting for the impacts of sublethal effects on reproduction and non-target mortality, nor for bioaccumulation of repeated sublethal exposures (166). Indeed, it has been demonstrated that subsequent exposures to AR may lead to increased adverse effects on the contaminated birds (159). Finally, it has also been suggested that the use of total sum of AR to assess the extent of exposure should rely on a quantification expressed in nmol/g instead of ng/g, that would better reflect the inhibitory potency on VKOR for each AR (159).

Beyond the assessment of exposure, liver AR dosing and more specifically the dosing of stereoisomers may provide information on the type of exposure and in the case of primary exposure may help to estimate the time from bait ingestion to death. Because stereoisomers have different elimination rates, the longer the time between ingestion and death, the greater the proportion of persistent enantiomers in the total residue (62, 74, 93). Conversely, the shorter the delay, the closer the ratio of enantiomers will be to the initial bait. This clue on time between ingestion and death might be useful to determine the cause of death. Indeed, it is unlikely that an AR can kill in <2 days. Moreover, a ratio of stereoisomers close, to that of the bait is in favor of a primary exposure.

Effect Biomarkers: Highlight Anticoagulant Rodenticides Effects

Blood Clotting Assessment

As anticoagulant rodenticides main action is on coagulation cascade, blood clotting assays are obvious and relevant diagnostic tools.

Prothrombin time (PT) measured on citrated plasma samples is considered a sensitive test to confirm AR contamination, as it is the first coagulation parameter to be altered after AR exposure, due to the short half-life of factor VII (6.2 h) (167). It should be noted, however, that in animals with clinical bleeding both PT and aPTT (activated Partial Thromboplastin Time) are prolonged, while thrombin time remains normal. Still, since assesses the extrinsic—or tissue factor—pathway of coagulation, it remains a more specific marker of AR intoxication, and is considered as a clinical standard for the diagnosis of AR intoxication (36, 120, 121, 152, 168).

PT as a diagnostic tool for AR contamination is widely described in dogs (118, 119, 121–123, 152, 168). Basal value for dogs is around 6–10 s, and is greatly prolonged after AR exposure, with reported median values between 40 (119) and

52.3 s (152). A commonly used threshold is a 25% increase over a control animal.

In ruminants, same mechanisms are expected, and there are also some reports of increased PT after AR exposure in cattle (124), sheep (85, 125), and goats (169), with similar variations. In one study, baseline PT for sheep was around 13.25 s (SD = 0.52), increasing up to 27–40.7 s after administration of the AR (125). As reference baseline values cannot be easily found for those animals, and values may differ among breeds and the analytical method used (170) [e.g., for sheep median values vary from 7.31 s in “mixed breed” ewes (171) to 40 s in a study with Austrian Mountain ewes (172)], the use of a control animal may be beneficial (85).

While PT seems a good biomarker of AR intoxication in domestic animals, no linear correlation was found between AR concentrations and extent of PT prolongation neither in dogs (152) nor in sheep (85).

It is worth noting that some research has previously been performed on the use of Proteins Induced by Vitamin K Antagonism or Absence (PIVKA) for the sensitive diagnosis of AR intoxication in dogs (173). The PIVKA test was originally designed to monitor human patients under treatment with coumadin and is still use in human medicine for diagnosis of e.g., hepatocellular carcinoma, pancreatic, or biliary tumors. This test is quite similar to the PT-test, using a diluted plasma sample and an “altered” thromboplastin that delays the *in vitro* clot formation, and thus may be more sensitive in detecting prolongation of clotting time by AR. Still, as the PT variation after AR exposure is usually marked, and with the availability and standardization of PT reagents, the PIVKA test was quite abandoned as a diagnostic tool, especially as results of this test can also be increased by deficiencies in factors II, VII, and X because of heredity and acquired coagulopathies other than anticoagulant poisonings, and is sensitive to the presence of heparin (168, 173).

Blood assays are also used for diagnosis of AR exposure in wildlife animals, especially birds of prey (61, 132, 174–176). In those animals, lengthening of PT by more than 25% or two standard deviations above baseline values is considered as suggestive of AR exposure (61). Although blood clotting assays seem promising for diagnosis of AR exposure in wildlife, there is still a need to establish species specific reference values and standardize assay methods among testing facilities (175). Among observations in wild birds, some studies showed that far greater PT values were observed in birds undergoing subsequent challenge exposure to AR than the ones observed in previously unexposed birds, suggesting a potentiation of AR adverse effects after repeated exposure as a sub-lethal effect of AR (158, 159). One limit of the PT assay in birds is the recommended use of homologous (i.e., avian) thromboplastin, not readily available, to efficiently trigger *in vitro* coagulation. Great variations (up to three-fold increase of PT, and even higher increase for aPTT) can occur when using human or mammalian (rabbit, bovine) thromboplastin for avian clotting assays (177–179). To complete avian blood coagulation assays, another test, Russel's Viper Venom Time, is routinely used, (159, 174–176), with observed increases of both “adapted” PT time and Russel's Viper Venom Time within 48–96 h following the exposure to AR

(174). Russell's viper venom is known to activate factor X in the common pathway of the clotting cascade (180). Finally, thrombin generation test and thromboelastometry can also be used, even if they don't bring any added value (181, 182).

Vitamin K-Dependent Proteins (VKDP) Dosage

Vitamin K-dependent proteins (VKDP) dosing might be an important source of biomarkers as the inhibition of the recycling mechanism of vitamin K has direct consequences on those proteins. Nevertheless, the challenge is not only to dose VKDP but also to dose separately carboxylated and under-carboxylated VKDP (ucVKDP). Indeed, AR molecules act on the post-translational gamma-carboxylation mechanism but not on the genetic expression of VKDP.

Vitamin K-dependent clotting factors

The dosing of vitamin K dependent clotting factors might be a good indicator of AR intoxication. These dosages are based either (i) on the evaluation of the activity of the clotting factor under consideration through a reaction cascade (close to the coagulation cascade) leading to the production of a chromogenic factor and where the dosed factor is the limiting factor, or (ii) on the supplementation of plasma depleted in the factor considered. Only carboxylated clotting factors should be assessed. As carboxylated clotting factors decrease faster than increase in clotting times arises, their dosing allows early detection of intoxication. For example, in rats and after an ingestion of a lethal dose of AR, the factor VII and factor X activity are halved in about 4 and 5 h, respectively, while prothrombin time doubles in 10 h (182). However, as the assessed clotting factors have to interact with reagent component optimized for humans, it is not obvious that this method is conceivable for all species. Moreover, there are not usual values for animals.

Other vitamin k-dependent proteins

If vitamin K dependent clotting factors are linked to the acute toxicosis of AR, other VKDP might be linked to their chronic effects. The two major non-clotting VKDP are osteocalcin (OC) and Matrix gla protein (MGP).

Osteocalcin limits bone formation without impairing bone resorption or mineralization (76). Under-carboxylated osteocalcin circulates naturally in bloodstream and seems to have positive effects on insulin sensitivity (183, 184). Moreover, several factors influence serum under-carboxylated osteocalcin levels notably osteoblastic synthesis, hormonal status, renal function, age, sex, timing of blood sampling, and specificity of the radioimmunoassay (185–187). Recently, a study showed that under-carboxylated osteocalcin increases in resistant rodents under vitamin K deficient diet (188). But currently there is no link between osteocalcin and chronic AR exposure effects. So, further research is needed to determine if carboxylated osteocalcin or under-carboxylated osteocalcin can be useful as biomarker of AR effects.

Conversely, under-carboxylated MGP (ucMGP) is well-known to be in favor of vascular calcification (189, 190), which is one of the suspected effects of chronic exposure to AR. In rats an increase of ucMGP resulting from a vitamin K deficiency

is associated to vascular calcification (191). Further studies are needed to confirm this association and the link with chronic AR exposure, but circulating ucMGP might be a good candidate as biomarker.

MGP and OC are small proteins currently measured by immunoassays. Their sequences are variable between species, which raises the question of assay methods. Their assay will require the development of specific antibodies in the absence of methods to evaluate their activity. Moreover, as they are proteins, their stability at room temperature in animal cadavers will be a challenge. These biomarkers will eventually be used as research tools, but their use in surveillance studies seems difficult in the future. On the other hand, they could be dosed on live animals as well as on dead animals, from blood (OC and MGP), bone (OC), vascular, pulmonary and renal tissues (MGP).

VKOR Activity

In mammals, two different enzymes possess Vitamin K epoxide Reductase activity (VKOR) and are coded by paralogous genes. The enzyme called VKORC1 is mainly located in the liver and is the main contributor to the recycling of Vitamin K needed for activation of clotting factors, while the enzyme called VKORC1L1 does not sustain coagulation but maintain the Vitamin K cycle for carboxylation of other VKDP (192, 193).

In human, sensibility to warfarin before an anticoagulant treatment can be assessed by testing alleles coding for VKORC1 to detect the presence of potential variants susceptible to adapt the proper dose of warfarin (194, 195). These are consequently biomarkers of the susceptibility to a rodenticide and this pharmacogenomic approach could be used as a preventive measure.

Thus, the study of the differences in VKOR activity for each species can be useful to evaluate their sensibility to AR. This assessment is currently based on enzymatic assays (73, 108), that implies either to sample fresh liver from considered species or to use heterologous expression of VKORC1 in yeast or eukaryotic cells. Then the inhibition capacity of each AR molecule can be tested *in vitro* against VKORC1 of each species. Two methods are currently described to measure VKOR activity, the DTT-driven VKOR assay (73) and the cell-based VKOR assay (196). The first method allows the characterization of the susceptibilities of VKOR activity from animal tissues or recombinant VKORC1 enzymes. The second method allows the characterization of VKOR activity only from overexpression of VKORC1 enzymes and required thus to know the amino acid sequence of the VKORC1. Unfortunately, VKORC1 sequence is known only for few species. Nevertheless, characterization of VKOR activity by *in vitro* assays assesses only the susceptibilities linked to VKORC1 and is cumbersome to implement.

Vitamins Quantification: Picture of the VKOR Activity

Vitamin K is available in organisms under different forms, called vitamers. A distinction can be made between vitamin K1, also called phyloquinone, of vegetal origin, and menaquinones (MK), from bacterial origin. All those vitamers share a common 2-methyl-1,4-naphthoquinone cycle, corresponding to vitamin K3, derived from synthesis or catabolism. Vitamin K1 has a

phytyl side chain at the 3-position, while MKs have several repeating prenyl units, the number of units being given as a suffix (menaquinone-n or MK-n) (197). Menaquinone-4 seems to have a major but not fully elucidated physiological role, and is the main form of vitamin K in the organism. It can be used in humans as drugs or supplements for newborns (198). MK-4 can be synthesized in the body, from vitamin K1 of feed origin or from vitamin K3, by a biosynthetic enzyme localized in the endoplasmic reticulum and ubiquitously expressed, known as UBIAD1 (199). MK-4 is also from microflora origin. Vitamin K1 is mainly found in liver and heart, with high storage capacities, while MK-4 is preferentially found in extrahepatic tissues, especially pancreas and testis (198). Nevertheless, from the authors' experience, some species have hepatic MK-4 concentrations higher than K1.

VKORC1 is partly responsible for the recycling of vitamin K: when the VKOR activity is impaired by AR, it can be assumed that it has an impact on the concentrations of those vitamins, with a possible shift between epoxide forms and quinone forms. A dose-response relationship was suggested between ratio of epoxide and quinone forms of vitamin K1 in plasma and concentrations of two AR, phenprocoumon and warfarin (200). It was also proposed to use measurements of this ratio for diagnosis of AR intoxication in dogs (201). Moreover, during a treatment with vitamin K1, if an animal is intoxicated by rodenticides the epoxide forms will increase the same way as the quinone form, while if it is not, only the concentration of vitamin K quinone will be increased. Thus, this method could be used to assess an intoxication while under treatment. Further studies will be necessary to explore vitamin K and vitamin K epoxide concentrations as potential markers of AR exposure. Nevertheless, because differences in vitamin K concentrations between species are predictable due to differences in diet and microflora, determination of usual values would be necessary for each species. One way to overcome this difficulty may be to assess the ratio between quinone and epoxide forms.

The measurement of vitamin K forms is usually performed by chromatography (liquid, high performance), that can be coupled with fluorescence (152) or mass spectrometry (157, 160–162) detection. The determination of vitamin K concentrations can be done in plasma, as the different forms circulate in the plasma in live animals. Nevertheless, their concentration in the plasma could be biased by the last meal. The determination of vitamins K can also be done post-mortem from different tissues, liver, kidney, etc. Nevertheless, the relevance of this assay in different tissues in relation to AR concentrations will require further studies. Nevertheless, vitamin K concentration measurement appear to be a promising route to provide relevant biomarkers. Vitamin K forms appear to be rather stable when the samples are protected from light.

Toward New Tools to Develop Biomarkers for Sublethal Effects of AR?

Cytochrome P450 Pattern or Activity

Cytochromes P450 (CYPs) are a superfamily of enzymes containing heme as a cofactor that function as monooxygenase.

CYPs are the major enzymes involved in drug metabolism, accounting for about 75% of the total metabolism of xenobiotics. Most xenobiotics are inactivated by CYPs, although some are bioactivated. The detection and quantification of specific metabolite(s) resulting from this metabolism can be a biomarker of exposure. In the case of AR and vitamin K, the pathways of metabolism are not really well-defined. Vitamin K1 metabolism would involve different CYPs. In humans, CYP4F11 and F2 have been identified. The metabolism of warfarin in humans involves CYP2C9, but also CYP1A2, 2C19, and 3A4. In rats CYP1A1, CYP2B1, CYP2C6, CYP2C11, and CYP3A2 (202) are involved in the oxidation of warfarin. The metabolism of other ARs is currently poorly characterized. Nevertheless, the intervention of CYP is probable because of the lipophilic nature of these molecules and the low number of functionalized groups present on the molecules (except for the OH group in position 4, only bromadiolone has a second hydroxy group). In addition, different arguments are present in the literature suggesting a CYP450-dependent metabolism. It has been shown that resistance to difenacoum or chlorophacinone may be caused by increased catabolism through Cytochrome P450 in exposed rodent population (115, 203). Bromadiolone also seems impacted by P450-promoted-catabolism level (117, 204).

Many drugs may increase or decrease the activity of various CYP isozymes either by inducing the biosynthesis of an isozyme (enzyme induction) or by directly inhibiting the activity of the CYP (enzyme inhibition). Many studies deal with Cytochromes P450 as biomarkers of xenobiotic exposure in the liver but also in the blood (easy ante-mortem analysis) thanks to plasma exosomes [e.g., (205–214)]. This enzyme family is really well-studied and known, and methodologies already exist for this kind of application, thus it is a promising approach. However, as Cytochromes P450 responsible of AR catabolism differ according to species and to AR molecules, extensive research is needed to implement this method.

Metabolomics and Genomics

Metabolic profiling, also called metabolomics, consists in a screening of a maximum of metabolic parameters, in a fresh biological sample, that should as far as possible be relevant to the precise state or condition of the organism from which the sample come from at the time of the sampling. The usual but non-exhaustive parameters studied are: the evolution of protein expression level, of metabolites, of biological parameters (lipids, proteins, carbohydrates, salts, vitamins...), of cell number and relative types, of redox and acido-basic parameters, etc. The parameters are as well qualitative for example by studying the structure of a molecule or the morphology of a cell, as quantitative, either relatively to a given parameter, either through absolute quantification (215).

One classical use of metabolic profiling is the research of very specific biomarkers for disease or exposure to xenobiotics (216–219). It could therefore be used to discover new specific biomarkers for rodenticides exposure. For example, an ethanolamide plasma lipids regulated by warfarin was found during a metabolomic study and could be used as biomarker of warfarin exposure (220). Moreover, metabolomic is also a

screenshot at a given time of many parameters from an organism and combined together, the data can provide a very precise map of the condition of the organism including several parameters (221, 222) converging toward an exposure at anticoagulant rodenticides and permitting differentiation between various levels and nature of exposure as shown already in one study with brodifacoum (223).

The limitation of this method is its current technical difficulty and the requirement of very advanced data analysis (215), including most likely the need of a significant pre-existing comparison database. However, this methodology could become easy, fast, and very reliable through automatization using artificial intelligence combined with deep learning algorithms.

On the other side, genomics is the study of global gene expression patterns. It addresses all genes and their inter relationships in order to identify their combined influence on the organism (224), and relies on DNA or RNA sequencing. A recent study on AR-positive bobcats (*Lynx rufus*) used RNA sequencing on whole blood to investigate genes and cellular processes affected by sublethal exposure to AR. Differential expressions of genes involved in xenobiotic metabolism, endoplasmic reticulum stress response, epithelial integrity and immune function were identified (145). In particular, simultaneous immune dysregulation and disruption of epithelial integrity was suspected to predispose bobcats exposed to AR to opportunistic infections by ectoparasites, e.g., notoedric mange caused by *Notoedres cati*, with an increased mortality rate. Beyond those conclusions, genomics appears as an interesting tool to study

all metabolic pathways impaired by AR exposure, allowing for the development of new indicators (e.g., biological parameters related to those metabolic functions) to assess the sublethal effects of AR.

CONCLUSION

If rodenticide anticoagulants are currently essentials to manage pest rodent populations, wildlife and domestic animal exposure to AR is a major concern. The exposure level of wildlife is important close to area with human activities. However, it is difficult to assess the consequences of exposure on the non-target animal population, since there are great differences of susceptibilities between species. The biomarkers can be useful tools in this task by highlighting AR effect on non-target species and thus to open the way to an evaluation of pest control practice in order to decrease AR impact. While some biomarkers seem promising, they are currently underdeveloped for AR monitoring purpose. Some of the biomarkers proposed in this study could be developed for systematic use in AR monitoring exposure in the field, while others, which are more complex to implement, could certainly only be developed for research purposes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AR, M-AM, XS, SL, and VL: conceptualization, writing—original draft preparation, and review. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Saeedi Saravi SS, Shokrzadeh M. Role of pesticides in human life in the modern age: a review. In: Stoytcheva M, éditeur. *Pesticides in the Modern World—Risks and Benefits*. InTech (2011).
- Sánchez-Bayo F. Impacts of Agricultural Pesticides on Terrestrial Ecosystems. *Ecol Impacts Toxic Chem.* (2011). p.63–87 doi: 10.2174/97816080512121110101
- Pimentel D. *Ecological Effects of Pesticides on Non-target Species*. Executive Office of the President—Office of Science and Technology. New York, NY: Executive Office of the President—Office of Science and Technology (1971).
- Tano ZJ. Ecological effects of pesticides, pesticides in the modern world—risks and benefits. In: Stoytcheva M, editor. *Ecological Effects of Pesticides*. InTech. (2011). p. 560.
- Talebi K, Hosseiniaveh V, Ghadamyari M. Ecological impacts of pesticides in agricultural ecosystem. In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides in the Modern World—Risks and Benefits*. InTech (2011).
- Lauret V, Delibes-Mateos M, Mougeot F, Arroyo-Lopez B. Understanding conservation conflicts associated with rodent outbreaks in farmland areas. *Ambio.* (2020) 49:1122–33. doi: 10.1007/s13280-019-01256-0
- Topping CJ, Elmeros M. Modeling exposure of mammalian predators to anticoagulant rodenticides. *Front Environ Sci.* (2016) 1:4. doi: 10.3389/fenvs.2016.00080
- Elliott JE, Rattner BA, Shore RF, Van Den Brink NW. Paying the pipers: mitigating the impact of anticoagulant rodenticides on predators and scavengers. *BioScience.* (2016) 66:401–7. doi: 10.1093/biosci/biw028
- Brown RA, Hardy AR, Greig-Smith PW, Edwards PJ. Assessing the impact of rodenticides on the environment. *EPPO Bulletin.* (1988) 18:283–92. doi: 10.1111/j.1365-2338.1988.tb00377.x
- Nakayama SMM, Morita A, Ikenaka Y, Mizukawa H, Ishizuka M. A review: poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally. *J Vet Med Sci.* (2019) 81:298–313. doi: 10.1292/jvms.17-0717
- Valchev I, Binev R, Yordanova V, Nikolov Y. Anticoagulant rodenticide intoxication in animals—a review. *Turk J Vet Anim Sci.* (2008) 32:7.
- Koivisto S, Laakso S, Suomalainen K. *Literature Review on Residues of Anticoagulant Rodenticides in Non-Target Animals*. Copenhagen: TemaNord; Nordic Council of Ministers (2010).
- Brakes CR, Smith RH. Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *J Appl Ecol.* (2005) 42:118–28. doi: 10.1111/j.1365-2664.2005.00997.x
- Rattner BA, Mastrota FN. Anticoagulant rodenticide toxicity to non-target wildlife under controlled exposure conditions. In: van den Brink NW, Elliott JE, Shore RF, Rattner BA, éditeurs. *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Cham: Springer International Publishing (2018). p. 45–86. (Emerging Topics in Ecotoxicology, vol. 5).
- Liphatech. *The Veterinarian's Guide to Accidental Rodenticide Ingestion by Dogs & Cats*. Milwaukee, WI: Liphatech (2019).
- Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol.* (2008) 141:757–63. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07119.x
- Byers KA, Lee MJ, Patrick DM, Himsworth CG. Rats about town: a systematic review of rat movement in urban ecosystems. *Front Ecol Evol.* (2019) 7:13. doi: 10.3389/fenvs.2019.00013
- Byers KA, Cox SM, Lam R, Himsworth CG. “They’re always there”: resident experiences of living with rats in a disadvantaged urban neighbourhood. *BMC Public Health.* (2019) 19:853. doi: 10.1186/s12889-019-7202-6
- Prakash I, éditeur. *Rodent Pest Management*. Boca Raton, FL: CRC Press (1988). p. 480.
- van den Brink NW, Elliott JE, Shore RF, Rattner BA, éditeurs. *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Cham: Springer International Publishing (2018). (Emerging Topics in Ecotoxicology, vol. 5).

21. Boyle CM. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature*. (1960) 188:517. doi: 10.1038/188517a0
22. Lefebvre S, Benoit E, Lattard V. Comparative biology of the resistance to vitamin K antagonists: an overview of the resistance mechanisms. In: Basaran O, Biteker M, éditeurs. *Anticoagulation Therapy*. InTech (2016). doi: 10.5772/64204
23. Goulois J, Lambert V, Legros L, Benoit E, Lattard V. Adaptive evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides. *Ecol Evol*. (2017) 7:2767–76. doi: 10.1002/ece3.2829
24. Marquez A, Khalil RA, Fourel I, Ovarburby T, Pinot A, Rosine A, et al. Resistance to anticoagulant rodenticides in Martinique could lead to inefficient rodent control in a context of endemic leptospirosis. *Sci Rep*. (2019) 9:13491. doi: 10.1038/s41598-019-49661-5
25. Quy RJ, Cowan DP, Prescott CV, Gill JE, Kerins GM, Dunsford G, et al. Control of a population of norway rats resistant to anticoagulant rodenticides. *Pestic Sci*. (1995) 45:247–56. doi: 10.1002/ps.2780450308
26. Mooney J, Lynch MR, Prescott CV, Clegg T, Loughlin M, Hannon B, et al. VKORC1 sequence variants associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Irish populations of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus*. *Sci Rep*. (2018) 8:4535. doi: 10.1038/s41598-018-22815-7
27. Suárez OV, Cueto GR. Comparison of efficacy of second-generation anticoagulant rodenticides: effect of active ingredients, type of formulation and commercial suppliers. *Cogent Food Agric*. (2018) 4:1525147. doi: 10.1080/23311932.2018.1525147
28. Quy RJ, Shepherd DS, Inglis IR. Bait avoidance and effectiveness of anticoagulant rodenticides against warfarin- and difenacoum-resistant populations of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Crop Prot*. (1992) 11:14–20. doi: 10.1016/0261-2194(92)90073-E
29. Quy RJ, Cowan DP, Morgan C, Swinney T. Palatability of rodenticide baits in relation to their effectiveness against farm populations of the Norway rat. In: *Proceedings of the Seventeenth Vertebrate Pest Conference 1996*. (1996).
30. Leung LK-P, Seth S, Starr CR, El S, Russell IW, King CA, et al. Selecting bait base to increase uptake of zinc phosphide and warfarin rodenticide baits. *Crop Prot*. (2007) 26:1281–6. doi: 10.1016/j.cropro.2006.11.002
31. Berny B, Esther A, Jacob J, Prescott C, European Commission, Directorate-General for the Environment. *Study on Risk Mitigation Measures for Anticoagulant Rodenticides as Biocidal Products: Final Report*. Publications Office (2014). Available online at: <http://bookshop.europa.eu/uri?target=EUBNOTICE:KH0215009:EN:HTML> (accessed September 30, 2020).
32. Nakagawa L, de Masi E, Narciso E, Neto HM, Papini S. Palatability and efficacy of bromadiolone rodenticide block bait previously exposed to environmental conditions. *Pest Manag Sci*. (2015) 71:1414–8. doi: 10.1002/ps.3944
33. Cox B, Smith RH. Rodenticide ecotoxicology: pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. In: *Proceedings of the Fifteenth Vertebrate Pest Conference*. (1992). Available online at: <http://digitalcommons.unl.edu/vp15/86> (accessed December, 2020).
34. Littin KE, O'Connor CE, Eason CT. Comparative effects of brodifacoum on rats and possums. *NZPP*. (2000) 53:310–5. doi: 10.30843/nzpp.2000.53.3701
35. Frankova M, Stejskal V, Aulicky R. Suppression of food intake by house mouse (*Mus musculus*) following ingestion of brodifacoum-based rodenticide bait. *Crop Prot*. (2017) 100:134–7. doi: 10.1016/j.cropro.2017.06.017
36. Lefebvre S, Fourel I, Queffelec S, Vodovar D, Mégarbane B, Benoit E, et al. Poisoning by anticoagulant rodenticides in humans and animals: causes and consequences. In: Malangu N, éditeur. *Poisoning—From Specific Toxic Agents to Novel Rapid and Simplified Techniques for Analysis*. InTech (2017).
37. Sejetun KO, Vindenes V, Øiestad EL, Brochmann G-W, Eliassen E, Moe L. Determination of anticoagulant rodenticides in faeces of exposed dogs and in a healthy dog population. *Acta Vet Scand*. (2020) 62:30. doi: 10.1186/s13028-020-00531-5
38. United States Environmental Protection Agency. *An Investigation of Anticoagulant Rodenticide Data Submitted to the Department of Pesticide Regulation*. California, CA: United States Environmental Protection Agency (2018), p. 35.
39. Walton KL, Otto CM. Retrospective evaluation of feline rodenticide exposure and gastrointestinal decontamination: 146 cases (2000–2010). *J Vet Emerg Crit Care*. (2018) 28:457–63. doi: 10.1111/vec.12748
40. Stahmann MA, Huebner CF, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. 5. Identification and synthesis of the hemorrhagic agent. *J Biol Chem*. (1941) 138:513–27.
41. Last JA. The missing link the story of Karl Paul link. *Toxicol Sci*. (2002) 66:4–6. doi: 10.1093/toxsci/66.1.4
42. Gault G, Lefebvre S, Benoit E, Lattard V, Grancher D. Variability of ferulol and ferprenin concentration in French giant fennel (*Ferula sp.*) leaves. *Toxicon*. (2019) 165:47–55. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.04.010
43. Lahmar R, Mahjoub T, Fourel I, Gault G, Grancher D. Giant fennel (*Ferula communis* L.) intoxication in goats in Tunisia. *Vet Rec Case Rep*. (2018) 6:e000738. doi: 10.1136/vetreccr-2018-000738
44. Alabau E, Mentaberre G, Camarero PR, Castillo-Contreras R, Sánchez-Barbudo IS, Conejero C, et al. Accumulation of diastereomers of anticoagulant rodenticides in wild boar from suburban areas: implications for human consumers. *Sci Total Environ*. (2020) 738:139828. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139828
45. Elmeros M, Bossi R, Christensen TK, Kjør L, Lassen B, Topping CJ. Exposure of non-target small mammals to anticoagulant rodenticide during chemical rodent control operations. *Environ Sci Pollut Res Int*. (2019) 26:6133–40. doi: 10.1007/s11356-018-04064-3
46. Geduhn A, Esther A, Schenke D, Mattes H, Jacob J. Spatial and temporal exposure patterns in non-target small mammals during brodifacoum rat control. *Sci Total Environ*. (2014) 496:328–38. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.07.049
47. Geduhn A, Esther A, Schenke D, Gabriel D, Jacob J. Prey composition modulates exposure risk to anticoagulant rodenticides in a sentinel predator, the barn owl. *Sci Total Environ*. (2016) 544:150–7. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.117
48. Koivisto E, Santangeli A, Koivisto B, Korkkolainen T, Vuorisalo T, Hanski IK, et al. The prevalence and correlates of anticoagulant rodenticide exposure in non-target predators and scavengers in Finland. *Sci Total Environ*. (2018) 642:701–7. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.063
49. Series LEK, Armenta TC, Moriarty JG, Boydston EE, Lyren LM, Poppenga RH, et al. Anticoagulant rodenticides in urban bobcats: exposure, risk factors and potential effects based on a 16-year study. *Ecotoxicology*. (2015) 24:844–62. doi: 10.1007/s10646-015-1429-5
50. Berny PJ, Buronfosse T, Buronfosse F, Lamarque F, Lorgue G. Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*. (1997) 35:1817–29. doi: 10.1016/S0045-6535(97)00242-7
51. 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*). *PLoS ONE*. (2015) 10:e0139191. doi: 10.1371/journal.pone.0139191
52. Sainsbury KA, Shore RF, Schofield H, Croose E, Pereira MG, Sleep D, et al. Long-term increase in secondary exposure to anticoagulant rodenticides in European polecats *Mustela putorius* in Great Britain. *Environ Pollut*. (2018) 236:689–98. doi: 10.1016/j.envpol.2018.02.004
53. Elmeros M, Lassen B, Bossi R, Topping CJ. Exposure of stone marten (*Martes foina*) and polecat (*Mustela putorius*) to anticoagulant rodenticides: effects of regulatory restrictions of rodenticide use. *Sci Total Environ*. (2018) 612:1358–64. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.034
54. López-Perea JJ, Camarero PR, Sánchez-Barbudo IS, Mateo R. Urbanization and cattle density are determinants in the exposure to anticoagulant rodenticides of non-target wildlife. *Environ Pollut*. (2019) 244:801–8. doi: 10.1016/j.envpol.2018.10.101
55. Elliott JE, Hindmarch S, Albert CA, Emery J, Mineau P, Maisonneuve F. Exposure pathways of anticoagulant rodenticides to nontarget wildlife. *Environ Monit Assess*. (2014) 186:895–906. doi: 10.1007/s10661-013-3422-x
56. Fourel I, Sage M, Benoit E, Lattard V. Liver and fecal samples suggest differential exposure of red fox (*Vulpes vulpes*) to trans- and cis-bromadiolone in areas from France treated with plant protection products. *Sci Total Environ*. (2018) 622-623:924–9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.053

57. Kupper J, Grobosch T, Kistler R, Sydler T, Naegeli H. Bromadiolone poisoning in foxes. *Schweiz Arch Tierheilkd.* (2006) 148:405–8. doi: 10.1024/0036-7281.148.8.405
58. Ruiz-Suárez N, Henríquez-Hernández LA, Valerón PE, Boada LD, Zumbado M, Camacho M, et al. Assessment of anticoagulant rodenticide exposure in six raptor species from the Canary Islands (Spain). *Sci Total Environ.* (2014) 485–486:371–6. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.094
59. Christensen TK, Lassen R, Elmeros M. High exposure rates of anticoagulant rodenticides in predatory bird species in intensively managed landscapes in Denmark. *Arch Environ Contam Toxicol.* (2012) 63:437–44. doi: 10.1007/s00244-012-9771-6
60. López-Perea JJ, Camarero PR, Molina-López RA, Párpel L, Obón E, Solá J, et al. Interspecific and geographical differences in anticoagulant rodenticide residues of predatory wildlife from the Mediterranean region of Spain. *Sci Total Environ.* (2015) 511:259–67. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.042
61. 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) 48:8433–45. doi: 10.1021/es501740n
62. Damin-Pernik M, Espana B, Besse S, Fourel I, Caruel H, Popowycz F, et al. Development of an ecofriendly anticoagulant rodenticide based on the stereochemistry of difenacoum. *Drug Metab Dispos.* (2016) 44:1872–80. doi: 10.1124/dmd.116.071688
63. Alomar H, Chabert A, Coeurdassier M, Vey D, Berny P. Accumulation of anticoagulant rodenticides (chlorophacinone, bromadiolone and brodifacoum) in a non-target invertebrate, the slug, *Deroceras reticulatum*. *Sci Total Environ.* (2018) 610–611:576–82. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.117
64. Danziger J. Vitamin K-dependent proteins, warfarin, and vascular calcification. *Clin J Am Soc Nephrol.* (2008) 3:1504–10. doi: 10.2215/CJN.00770208
65. Rost S, Pelz H-J, Menzel S, MacNicol 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. doi: 10.1186/1471-2156-10-4
66. 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.* (2016) 344–346:34–41. doi: 10.1016/j.tox.2016.02.002
67. Feinstein DL, Akpa BS, Aye MA, Boulelle AI, Braun D, Brodsky SV, et al. The emerging threat of superwarfarins: history, detection, mechanisms, and countermeasures: the emerging threat of superwarfarins. *Ann NY Acad Sci.* (2016) 1374:111–22. doi: 10.1111/nyas.13085
68. Tie J-K, Jin D-Y, Straight DL, Stafford DW. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. *Blood.* (2011) 117:2967–74. doi: 10.1182/blood-2010-08-304303
69. 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) 456:47–54. doi: 10.1042/BJ20130639
70. Gong X, Gutala R, Jaiswal AK. Quinone oxidoreductases and vitamin K metabolism. In: Litwack G, Lake T, editors. *Vitamins and Hormones*. North Hollywood, CA: Elsevier (2008). p. 85–101.
71. Tie J-K, Stafford DW. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost.* (2016) 14:236–47. doi: 10.1111/jth.13217
72. Thijssen HHW, Baars LGM. Microsomal warfarin binding and vitamin K 2,3-epoxide reductase. *Biochem Pharmacol.* (1989) 38:1115–20. doi: 10.1016/0006-2952(89)90257-8
73. Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E, Lattard V. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys.* (2011) 515:14–20. doi: 10.1016/j.abb.2011.08.010
74. Lefebvre S, Fourel I, Chatron N, Caruel H, Benoit E, Lattard V. Comparative biological properties of the four stereoisomers of difethialone, a second-generation anticoagulant rodenticide, in rats: development of a model allowing to choose the appropriate stereoisomeric ratio. *Arch Toxicol.* (2020) 94:795–801. doi: 10.1007/s00204-020-02662-0
75. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone.* (2016) 82:42–9. doi: 10.1016/j.bone.2015.05.046
76. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* (1996) 382:448–52. doi: 10.1038/382448a0
77. 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) 386:78–81. doi: 10.1038/386078a0
78. Watt BE, Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA. Anticoagulant rodenticides. *Toxicol Rev.* (2005) 24:259–69. doi: 10.2165/00139709-200524040-00005
79. Kataranovski M, Mirkov I, Vrankovic J, Kataranovski D, Subota V. Percutaneous toxicity of anticoagulant warfarin in rats. *Cutan Ocul Toxicol.* (2008) 27:29–40. doi: 10.1080/15569520701860999
80. O'Reilly RA, Aggeler PM. Studies on coumarin anticoagulant drugs: initiation of warfarin therapy without a loading dose. *Circulation.* (1968) 38:169–77. doi: 10.1161/01.CIR.38.1.169
81. Subota V, Mirkov I, Demenesku J, Popov Aleksandrov A, Ninkov, Mileusnic D, et al. Transdermal toxicity of topically applied anticoagulant rodenticide warfarin in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* (2015) 41:232–40. doi: 10.1016/j.etap.2015.12.006
82. Huckle KR, Hutson DH, Warburton PA. Elimination and accumulation of the rodenticide flocoumafen in rats following repeated oral administration. *Xenobiotica.* (1988) 18:1465–79. doi: 10.3109/00498258809042269
83. Chetot T, Mouette-Bonnet M, Taufana S, Fourel I, Lefebvre S, Benoit E, et al. Differences in teratogenicity of some vitamin K antagonist substances used as human therapeutic or rodenticide are due to major differences in their fate after an oral administration. *Toxicol Lett.* (2020) 333:71–9. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.07.034
84. Eadsforth CV, Gray A, Huckle KR, Inglesfield C. The dietary toxicity of flocoumafen to hens: elimination and accumulation following repeated oral administration. *Pestic Sci.* (1993) 38:17–25. doi: 10.1002/ps.2780380104
85. Moriceau M-A, Lefebvre S, Fourel I, Benoit E, Rattner BA, Lattard V. Accidental chlorophacinone exposure of lactating ewes: clinical follow-up and human health dietary implications. *Food Chem Toxicol.* (2020) 143:111518. doi: 10.1016/j.fct.2020.111518
86. Huckle KR, Hutson DH, Logan CJ, Morrison BJ, Warburton PA. The fate of the rodenticide flocoumafen in the rat: retention and elimination of a single oral dose. *Pestic Sci.* (1989) 25:297–312. doi: 10.1002/ps.2780250310
87. Kamil N. Kinetics of bromadiolone, anticoagulant rodenticide, in the norway rat (*Rattus norvegicus*). *Pharmacol Res Commun.* (1987) 19:767–75. doi: 10.1016/0031-6989(87)90011-7
88. Horak KE, Fisher PM, Hopkins B. Pharmacokinetics of anticoagulant rodenticides in target and non-target organisms. In: van den Brink NW, Elliott JE, Shore RF, Rattner BA, editors. *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Cham: Springer International Publishing (2018). p. 87–108. available online at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-64377-9_4 (accessed February 5, 2020).
89. Vandebroucke V, Bousquet-Melou A, Backer PD, Croubels S. Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J Vet Pharmacol Ther.* (2008) 31:437–45. doi: 10.1111/j.1365-2885.2008.00979.x
90. Fisher P, O'Connor C, Wright G, Eason CT. Persistence of four anticoagulant rodenticides in the livers of laboratory rats. In: *Doc Science Internal Series*. Vol. 139 (2003). p. 19.
91. Goulois J. *Diversité des modes de résistance de cible aux antivitamines K chez les rongeurs* (Thèse de Doctorat). Université de Lyon 1, Villeurbanne, France (2016).
92. Bachmann KA, Sullivan TJ. Disposition and pharmacodynamic characteristics of brodifacoum in warfarin-sensitive rats. *Pharmacology.* (1983) 27:281–8. doi: 10.1159/000137881
93. Damin-Pernik M, Espana B, Lefebvre S, Fourel I, Caruel H, Benoit E, et al. Management of rodent populations by anticoagulant rodenticides: toward third-generation anticoagulant rodenticides. *Drug Metab Dispos.* (2017) 45:160–5. doi: 10.1124/dmd.116.073791
94. Kaminsky LS, Zhang ZY. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther.* (1997) 73:67–74. doi: 10.1016/S0163-7258(96)00140-4
95. Yacobi A, Levy G. Pharmacokinetics of the warfarin enantiomers in rats. *J Pharmacokinetic Biopharm.* (1974) 2:239–55. doi: 10.1007/BF01059764
96. Deckert FW. Warfarin metabolism in the guinea pig. I. Pharmacological studies. *Drug Metab Dispos.* (1973) 1:704–10.

97. Powell ML, Pope B, Elmer GW, Trager WF. Biliary excretion of warfarin metabolites and their metabolism by rat gut flora. *Life Sci.* (1977) 20:171–7. doi: 10.1016/0024-3205(77)90145-X
98. Enouri S, Dekroon K, Friendship R, Dowling PM. Depletion of bromadiolone in tissues of hogs following oral exposure. *J Swine Health Prod.* (2015) 23:8.
99. Poché RM. Rodent tissue residue and secondary hazard studies with bromadiolone. *EPPO Bull.* (1988) 18:323–30. doi: 10.1111/j.1365-2338.1988.tb00382.x
100. Tomlin C, British Crop Protection Council, Royal Society of Chemistry (Great Britain), Information Services. *The Pesticide Manual: A World Compendium: Incorporating the Agrochemicals Handbook*. Farnham, Surrey, Cambridge: British Crop Protection Council, Royal Society of Chemistry, Information Sciences (1994).
101. Pelfrène AF. Chapter 100—Rodenticides. In: *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 3rd ed. New York, NY: Academic Press (2010), p. 2153–217. Available online at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123743671001002> (accessed July 8, 2020).
102. Murphy MJ. Chapter 46—anticoagulant rodenticides. In: Gupta RC, éditeur. *Veterinary Toxicology*, 3rd ed. Academic Press (2018), p. 583–612. Available online at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012811410000465> (accessed January, 23 2020).
103. Tashva M, International Programme on Chemical Safety, Weltgesundheitsorganisation, éditeurs. *Anticoagulant Rodenticides*. Geneva: World Health Organization (1995), p. 121. (Environmental health criteria).
104. Bull JO. Laboratory and field investigations with difenacoum, a promising new rodenticide. *Proc Vertebr Pest Conf.* (1976) 7:72–84.
105. Gupta RC, éditeur. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Waltham: Elsevier (2020) 7:72–84.
106. Lechevin JC, Poche RM. Activity of LM 2219 (difethialone), a new anticoagulant rodenticide, in commensal rodents. In: *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference* (1988).
107. Goulois J, Chapuzet A, Lambert V, Chatron N, Tchertanov L, Legros L, et al. Evidence of a target resistance to antivitamin K rodenticides in the roof rat *Rattus rattus*: identification and characterisation of a novel Y25F mutation in the *Vkorc1* gene. *Pest Manag Sci.* (2016) 72:544–50. doi: 10.1002/ps.4020
108. Hodroge A, Matagrín B, Moreau C, Fourel I, Hamed A, Benoit E, et al. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J Thromb Haemost.* (2012) 10:2535–43. doi: 10.1111/jth.12019
109. Jacob J, Freise JF. Food choice and impact of food sources from farms on blood coagulation in rodenticide resistant Norway rats. *Crop Prot.* (2011) 30:1501–7. doi: 10.1016/j.cropro.2011.06.009
110. Witmer GW, Snow NR, Moulton RS. The effects of vitamin K1-rich plant foods on the efficacy of the anticoagulant rodenticides chlorophacinone and diphacinone, used against Montane Voles (*Microtus montanus*). *Int J Pest Manag.* (2013) 59:205–10. doi: 10.1080/09670874.2013.816453
111. Watanabe KB, Saengtienchai A, Tanaka KD, Ikenaka Y, Ishizuka M. Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* (2010) 152:114–9. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.03.006
112. Crowell M, Eason C, Hix S, Broome K, Fairweather A, Moltchanova E, et al. First generation anticoagulant rodenticide persistence in large mammals and implications for wildlife management. *N Z J Zool.* (2013) 40:205–16. doi: 10.1080/03014223.2012.746234
113. Pearce R, Greenway D, Parkinson A. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Arch Biochem Biophys.* (1992) 298:211–25. doi: 10.1016/0003-9861(92)90115-D
114. Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, et al. Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab Dispos.* (2007) 35:62–6. doi: 10.1124/dmd.106.011775
115. Boitet M, Hamed A, Chatron N, Debaux JV, Benoit E, Lattard V. Elevated difenacoum metabolism is involved in the difenacoum-resistant phenotype observed in Berkshire rats homozygous for the L120Q mutation in the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*Vkorc1*) gene resistance to difenacoum of Berkshire rats. *Pest Manag Sci.* (2018) 74:1328–34. doi: 10.1002/ps.4797
116. Horak KE, Campion CM, Volker SF. Are reports of reduced field efficacy of diphacinone and chlorophacinone in California ground squirrels (*Otospermophilus beecheyi*) due to elevated rodenticide metabolism? *Crop Prot.* (2020) 127:104969. doi: 10.1016/j.cropro.2019.104969
117. Markussen MD, Heiberg A-C, Fredholm M, Kristensen M. Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: a possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance. *Pest Manag Sci.* (2008) 64:239–48. doi: 10.1002/ps.1506
118. Berry CR, Gallaway A, Thrall DE, Carlisle C. Thoracic radiographic features of anticoagulant rodenticide toxicity in fourteen dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* (1993) 34:391–6. doi: 10.1111/j.1740-8261.1993.tb02026.x
119. Sheafar S, Couto C. Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* (1999) 35:38–46. doi: 10.5326/15473317-35-1-38
120. Murphy MJ. Rodenticides. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* (2002) 32:469–84. doi: 10.1016/S0195-5616(01)00003-1
121. Woody BJ, Murphy MJ, Ray AiC, Green RA. Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. *J Vet Intern Med.* (1992) 6:23–8. doi: 10.1111/j.1939-1676.1992.tb00981.x
122. Pitterino C, Paolo B, Tristo G. Clinical and pathological features of anticoagulant rodenticide intoxications in dogs. *Vet Hum Toxicol.* (2004) 46:70–5.
123. Griggs AN, Allbaugh RA, Tofflemire KL, Ben-Shlomo G, Whitley D, Paulsen ME. Anticoagulant rodenticide toxicity in six dogs presenting for ocular disease. *Vet Ophthalmol.* (2016) 19:73–80. doi: 10.1111/vop.12267
124. Bullard RW, Thompson RD, Kilburn SR. Diphenadione residues in milk of cattle. *J Agric Food Chem.* (1977) 25:79–81. doi: 10.1021/jf60209a042
125. Berny PJ, de Oliveira LA, Videmann B, Rossi S. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *Am J Vet Res.* (2006) 67:363–71. doi: 10.2460/ajvr.67.2.363
126. Piero FD, Poppenga RH. Chlorophacinone exposure causing an epizootic of acute fatal hemorrhage in lambs. *J VET Diagn Invest.* (2006) 18:483–5. doi: 10.1177/104063870601800512
127. McConico RS, Copedge K, Bischoff KL. Brodifacoum toxicosis in two horses. *J Am Vet Med Assoc.* (1997) 211:882–6.
128. Ayala I, Rodríguez MJ, Martos N, Zilbershtein J, Ruiz I, Motas M. Fatal brodifacoum poisoning in a pony. *Can Vet J.* (2007) 48:627–9.
129. Zakian A, Mami S, Nouri M, Razi-Jalali S, Tehrani-Sharif M. Spontaneous Brodifacoum toxicosis and abortion in an Arabian mare. *Vet Res Forum.* (2019) 10:173–6. doi: 10.30466/vrf.2018.85534.2115
130. Murray M. Ante-mortem and post-mortem signs of anticoagulant rodenticide toxicosis in birds of prey. In: van den Brink NW, Elliott JE, Shore RF, Rattner BA, éditeurs. *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Cham: Springer International Publishing (2018), p. 109–34.
131. Murray M. Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in four species of birds of prey presented to a wildlife clinic in Massachusetts, 2006–2010. *J Zoo Wildlife Med.* (2011) 42:88–97. doi: 10.1638/2010-0188.1
132. Rattner BA, Horak KE, Warner SE, Day DD, Meteyer CU, Volker SF, et al. Acute toxicity, histopathology, and coagulopathy in American kestrels (*Falco sparverius*) following administration of the rodenticide diphacinone. *Environ Toxicol Chem.* (2011) 30:1213–22. doi: 10.1002/etc.490
133. Ware KM, Feinstein DL, Rubinstein I, Weinberg G, Rovin BH, Hebert L, et al. Brodifacoum induces early hemoglobinuria and late hematuria in rats: novel rapid biomarkers of poisoning. *Am J Nephrol.* (2015) 41:392–9. doi: 10.1159/000433568
134. Poterucha TJ, Goldhaber SZ. Warfarin and vascular calcification. *Am J Med.* (2016) 129:635.e1–e4. doi: 10.1016/j.amjmed.2015.11.032
135. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1998) 18:1400–7. doi: 10.1161/01.ATV.18.9.1400
136. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: leptospirosis and unexplained acute febrile illness among athletes participating in triathlons—Illinois and Wisconsin, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* (1998) 47:673–06.

137. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz H-J, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. (2004) 427:537–41. doi: 10.1038/nature02214
138. Knopper LD, Mineau P, Walker LA, Shore RF. Bone density and breaking strength in UK raptors exposed to second generation anticoagulant rodenticides. *Bull Environ Contam Toxicol*. (2007) 78:249–51. doi: 10.1007/s00128-007-9122-x
139. Chetot T, Taufana S, Benoit E, Lattard V. Vitamin K antagonist rodenticides display different teratogenic activity. *Reprod Toxicol*. (2020) 93:131–6. doi: 10.1016/j.reprotox.2020.02.003
140. Howe AM, Webster WS. The warfarin embryopathy: a rat model showing maxillofacial hypoplasia and other skeletal disturbances. *Teratology*. (1992) 46:379–90. doi: 10.1002/tera.1420460408
141. Koos R, Mahnken AH, Mühlenbruch G, Brandenburg V, Pflueger B, Wildberger JE, et al. Relation of oral anticoagulation to cardiac valvular and coronary calcium assessed by multislice spiral computed tomography. *Am J Cardiol*. (2005) 96:747–9. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.05.014
142. Serieys LEK, Lea AJ, Epeldegui M, Armenta TC, Moriarty J, VandeWoude S, et al. Urbanization and anticoagulant poisons promote immune dysfunction in bobcats. *Proc Biol Sci*. (2018) 285:20172533. doi: 10.1098/rspb.2017.2533
143. Schroocksadel S, Gostner J, Jenny M, Kurz K, Schennach H, Weiss G, et al. Immunomodulatory effects *in vitro* of vitamin K antagonist acenocoumarol. *Thromb Res*. (2013) 131:e264–9. doi: 10.1016/j.thromres.2013.02.012
144. Belij S, Miljković D, Popov A, Subota V, Timotijević G, Slavić M, et al. Effects of subacute oral warfarin administration on peripheral blood granulocytes in rats. *Food Chem Toxicol*. (2012) 50:1499–507. doi: 10.1016/j.fct.2012.01.049
145. Fraser D, Mouton A, Serieys LEK, Cole S, Carver S, Vandewoude S, et al. Genome-wide expression reveals multiple systemic effects associated with detection of anticoagulant poisons in bobcats (*Lynx rufus*). *Mol Ecol*. (2018) 27:1170–87. doi: 10.1111/mec.14531
146. Bonwitt J, Kelly AH, Ansumana R, Agbla S, Sahr F, Saez AM, et al. Rat-stouille: a mixed method study to characterize rodent hunting and consumption in the context of lassa fever. *EcoHealth*. (2016) 13:234–47. doi: 10.1007/s10393-016-1098-8
147. López-Barea J. Biomarkers in ecotoxicology: an overview. In: Degen GH, Seiler JB, Bentley P, editors. *Toxicology in Transition*. Berlin, Heidelberg: Springer (1995). p. 57–79.
148. Porte-Visa C, van den Brink N, van der Oost R. Biomarkers in environmental assessment. In: Munawar M, den Besten P, editors. *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems*. Florida, FL: CRC Press (2005). p. 87–152.
149. van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*. (2003) 13:57–149. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6
150. Gracey AY, Troll JV, Somero GN. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proc Natl Acad Sci*. (2001) 98:1993–8. doi: 10.1073/pnas.98.4.1993
151. Forbes VE, Palmqvist A, Bach L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem*. (2006) 25:272–80. doi: 10.1897/05-257R.1
152. Waddell LS, Poppenga RH, Drobatz KJ. Anticoagulant rodenticide screening in dogs: 123 cases (1996–2003). *J Am Vet Med Assoc*. (2013) 242:516–21. doi: 10.2460/javma.242.4.516
153. O'Bryan SM, Constable DJC. Quantification of brodifacoum in plasma and liver tissue by HPLC. *J Anal Toxicol*. (1991) 15:144–7. doi: 10.1093/jat/15.3.144
154. Seljetun KO, Eliassen E, Karinen R, Moe L, Vindenes V. Quantitative method for analysis of six anticoagulant rodenticides in faeces, applied in a case with repeated samples from a dog. *Acta Vet Scand*. (2018) 60:3. doi: 10.1186/s13028-018-0357-9
155. Laas FJ, Fors DA, Godfrey MER. Retention of brodifacoum in sheep tissues and excretion in faeces. *N Z J Agric Res*. (1985) 28:357–9. doi: 10.1080/00288233.1985.10430438
156. Jacquot M, Coeurdassier M, Sage M, Fourel I, Dinkel A, Parmentier A-L, et al. Linking predator exposure and patterns of treatments with anticoagulant rodenticides by using faeces. In: *9th European Vertebrate Pest Management Conference*. Turku (2013). Available online at: hal.archives-ouvertes.fr/hal-00867352 (accessed June 11, 2020).
157. Sage M, Fourel I, Coeurdassier M, Barrat J, Berry P, Giraudoux P. Determination of brodifacoum residues in fox faeces by LC/ESI-MS in relationship with toxicological data and clinical signs after repeated exposure. *Environ Res*. (2010) 110:664–74. doi: 10.1016/j.envres.2010.07.009
158. Butler SE. *The Sub-Lethal Effects of Second Generation Anticoagulant Rodenticides on Birds* (thesis). University of Leicester, Leicester, England (2011).
159. Rattner BA, Volker SF, Lanckton JS, Bean TG, Lazarus RS, Horak KE. Brodifacoum toxicity in American Kestrels (*Falco sparverius*) with evidence of increased hazard on subsequent anticoagulant rodenticide exposure. *Environ Toxicol Chem*. (2020) 39:468–81. doi: 10.1002/etc.4629
160. Thomas PJ, Mineau P, Shore RE, Champoux L, Martin PA, Wilson LK, et al. Second generation anticoagulant rodenticides in predatory birds: probabilistic characterisation of toxic liver concentrations and implications for predatory bird populations in Canada. *Environ Int*. (2011) 37:914–20. doi: 10.1016/j.envint.2011.03.010
161. Fourel I, Berlioz-Barbier A, Benoit E. Mass spectrometry characterization of anticoagulant rodenticides and hydroxyl metabolites. *Rapid Commun Mass Spectrom*. (2020) 34:1–10. doi: 10.1002/rcm.8871
162. Fourel I, Damin-Pernik M, Benoit E, Lattard V. Core-shell LC-MS/MS method for quantification of second generation anticoagulant rodenticides diastereoisomers in rat liver in relationship with exposure of wild rats. *J Chromatogr B*. (2017) 1041–1042:120–32. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.12.028
163. Prat-Mairet Y, Fourel I, Barrat J, Sage M, Giraudoux P, Coeurdassier M. Non-invasive monitoring of red fox exposure to rodenticides from scats. *Ecol Indic*. (2017) 72:777–83. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.08.058
164. Seljetun KO, Sandvik M, Vindenes V, Eliassen E, Øiestad EL, Maddsen K, et al. Comparison of anticoagulant rodenticide concentrations in liver and feces from apparently healthy red foxes. *J VET Diagn Invest*. (2020) 32:560–4. doi: 10.1177/1040638720927365
165. Newton I, Shore RE, Wyllie I, Birks JDS, Dale L. *Empirical Evidence of Side-Effects of Rodenticides on Some Predatory Birds and Mammals* (1999).
166. Erickson W, Urban D. *Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mammals: a Comparative Approach*. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticides Programs Environmental Fate and Effects Division (2004). p. 230.
167. Hellemans J, Vorlat M, Verstraete M. Survival time of prothrombin and factors VII, IX and X after completely synthesis blocking doses of coumarin derivatives. *Br J Haematol*. (1963) 9:506–12. doi: 10.1111/j.1365-2141.1963.tb05475.x
168. Rozanski EA, Drobatz KJ, Hugher D, Scotti M, Giger U. Thrombotest (PIVKA) test results in 25 dogs with acquired and hereditary coagulopathies. *J Vet Emer Crit*. (1999) 9:73–8. doi: 10.1111/j.1476-4431.1999.tb00072.x
169. Martin G, Sutherland R, Robertson I, Kirkpatrick W, King D, Hood P. Assessment of the potential toxicity of a poison for rabbits, pindone (2-pivalyl 1, 3 indandione), to domestic animals. *Aust Vet J*. (1991) 68:241–3. doi: 10.1111/j.1751-0813.1991.tb03217.x
170. Foley SR, Solano C, Simonova G, Spanevello MM, Bird RJ, Semple JW, et al. A comprehensive study of ovine haemostasis to assess suitability to model human coagulation. *Thromb Res*. (2014) 134:468–73. doi: 10.1016/j.thromres.2014.05.026
171. Leite Carlos. Influence of sex on activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT) in sheep. *Veterinaria Italiana*. (2017) 53:255–8. doi: 10.12834/VetIt.278.1021.3
172. Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger B, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost*. (2008) 100:397–404. doi: 10.1160/TH08-02-0103
173. Mount ME, Kim BU, Kass PH. Use of a test for proteins induced by vitamin K absence or antagonism in diagnosis of anticoagulant poisoning in dogs: 325 cases (1987–1997). *J Am Vet Med Assoc*. (2003) 222:194–8. doi: 10.2460/javma.2003.222.194
174. Rattner BA, Horak KE, Lazarus RS, Eisenreich KM, Meteyer CU, Volker SF, et al. Assessment of toxicity and potential risk of the anticoagulant

- rodenticide diphacinone using Eastern screech-owls (*Megascops asio*). *Ecotoxicology*. (2012) 21:832–46. doi: 10.1007/s10646-011-0844-5
175. Hindmarch S, Rattner BA, Elliott JE. Use of blood clotting assays to assess potential anticoagulant rodenticide exposure and effects in free-ranging birds of prey. *Sci Total Environ*. (2019) 657:1205–16. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.485
 176. Rattner BA, Horak KE, Warner SE, Johnston JJ. Acute toxicity of diphacinone in Northern bobwhite: effects on survival and blood clotting. *Ecotoxicol Environ Safety*. (2010) 73:1159–64. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.05.021
 177. Doerr JA, Wyatt RD, Hamilton PB. Investigation and standardization of prothrombin times in chickens. *Poult Sci*. (1975) 54:969–80. doi: 10.3382/ps.0540969
 178. Guddorf V, Kummerfeld N, Mischke R. BMTW- Methodical aspects of blood coagulation measurements in birds applying commercial reagents—a pilot study. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. (2014) 127:322–7. doi: 10.2376/0005-9366-127-322
 179. Thomson AE, Squires EJ, Gentry PA. Assessment of factor V, VII and X activities, the key coagulant proteins of the tissue factor pathway in poultry plasma. *Br Poult Sci*. (2002) 43:313–21. doi: 10.1080/00071660120121553
 180. Triplett DA, Harms CS. Coagulation screening assays: Russell's viper venom time. In: *Procedures for the Coagulation Laboratory*. Chicago: Educational Products Division, American Society of Clinical Pathologists (1943). p. 15–7.
 181. Jourdi G, Lefebvre S, Le Bonniec B, Curis E, Gaussem P, Lattard V, et al. Thrombin generation test: a reliable tool to evaluate the pharmacodynamics of vitamin K antagonist rodenticides in rats. *Pestic Biochem Physiol*. (2018) 146:19–24. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.05.003
 182. Lefebvre S, Hascoët C, Damin-Pernik M, Rannou B, Benoit E, Lattard V. Monitoring of antivitamin K-dependent anticoagulation in rodents—towards an evolution of the methodology to detect resistance in rodents. *Pestic Biochem Physiol*. (2017) 138:29–36. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.02.003
 183. Hill HS, Grams J, Walton RG, Liu J, Modlering DR, Garvey WT. Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes. *Horm Metab Res*. (2014) 46:341–7. doi: 10.1055/s-0034-1368709
 184. Hwang Y-C, Jeong I-K, Ahn KJ, Chung HY. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced β -cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev*. (2009) 25:768–72. doi: 10.1002/dmrr.1045
 185. Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res*. (1988) 226:267–91. doi: 10.1097/00003086-198801000-00036
 186. Pietschmann P. Osteocalcin. *Wien Med Wochenschr*. (1990) 140:493–4.
 187. Lepage OM, Marcoux M, Tremblay A. Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Can J Vet Res*. (1990) 54:223–6.
 188. Debaux JV, Hamed A, Barbier B, Chetot T, Benoit E, Lefebvre S, et al. Establishment of the variation of vitamin K status according to Vkorc1 point mutations using rat models. *Nutrients*. (2019) 11:2076. doi: 10.3390/nu11092076
 189. Heuvel EGHM van den, van Schoor NM, Lips P, Magdeleyns EJR, Deeg DJH, Vermeer C, et al. Circulating uncarboxylated matrix Gla protein, a marker of vitamin K status, as a risk factor of cardiovascular disease. *Maturitas*. (2014) 77:137–41. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.10.008
 190. Delanaye P, Krzesinski J-M, Warling X, Moonen M, Smelten N, Médart L, et al. Dephosphorylated-uncarboxylated Matrix Gla protein concentration is predictive of vitamin K status and is correlated with vascular calcification in a cohort of hemodialysis patients. *BMC Nephrol*. (2014) 15:145. doi: 10.1186/1471-2369-15-145
 191. Michaux A, Matagrín B, Debaux J-V, Schurgers LJ, Benoit E, Lattard V. Missense mutation of VKORC1 leads to medial arterial calcification in rats. *Sci Rep*. (2018) 8:13733. doi: 10.1038/s41598-018-31788-6
 192. Caspers M, Czogalla KJ, Liphardt K, Müller J, Westhofen P, Watzka M, et al. Two enzymes catalyze vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in mouse: VKORC1 is highly expressed in exocrine tissues while VKORC1L1 is highly expressed in brain. *Thromb Res*. (2015) 135:977–83. doi: 10.1016/j.thromres.2015.01.025
 193. Lacombe J, Ferron M. VKORC1L1, an enzyme mediating the effect of vitamin K in liver and extrahepatic tissues. *Nutrients*. (2018) 10:970. doi: 10.3390/nu10080970
 194. Flockhart DA, O'Kane D, Williams MS, Watson MS, Flockhart DA, Gage B, et al. Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin. *Genet Med*. (2008) 10:139–50. doi: 10.1097/GIM.0b013e318163c35f
 195. Grossniklaus D. Testing of VKORC1 and CYP2C9 alleles to guide warfarin dosing. *Test Category: pharmacogenomic (treatment)*. *PLoS Curr*. (2010) 2:RRN1155. doi: 10.1371/currents.RRN1155
 196. Tie J-K, Stafford DW. Chapter fourteen—functional study of the vitamin K cycle enzymes in live cells. In: Gelb MH, éditeur. *Methods in Enzymology*. Academic Press (2017). p. 349–94. (Enzymology at the Membrane Interface: Intramembrane Proteases; vol. 584). Available online at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687916303792> (accessed October 24, 2018).
 197. Booth SL, Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr*. (1998) 128:785–8. doi: 10.1093/jn/128.5.785
 198. Ronden JE, Thijssen HH, Vermeer C. Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat. *Biochim Biophys Acta*. (1998) 1379:16–22. doi: 10.1016/S0304-4165(97)00075-5
 199. Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, et al. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*. (2010) 468:117–21. doi: 10.1038/nature09464
 200. Schmidt W, Beermann D, Oesch F, Jähnchen E. Differential effect of the enantiomers of phenprocoumon and warfarin on the vitamin K1-epoxide/vitamin K1 ratio in rat plasma. *J Pharm Pharmacol*. (1979) 31:490–1. doi: 10.1111/j.2042-7158.1979.tb13567.x
 201. Mount ME, Kass PH. Diagnostic importance of vitamin K1 and its epoxide measured in serum of dogs exposed to an anticoagulant rodenticide. *Am J Vet Res*. (1989) 50:1704–9.
 202. 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*. (1982) 21:6019–30. doi: 10.1021/bi00266a045
 203. Horak KE, Volker SF, Campton CM. Increased diphacinone and chlorfacinone metabolism in previously exposed wild caught voles, *Microtus californicus*. *Crop Prot*. (2015) 78:35–9. doi: 10.1016/j.cropro.2015.08.011
 204. Markussen MDK, Heiberg A-C, Fredholm M, Kristensen M. Identification of cytochrome P450 differentiated expression related to developmental stages in bromadiolone resistance in rats (*Rattus norvegicus*). *Pest Biochem Physiol*. (2008) 91:147–52. doi: 10.1016/j.pestbp.2008.03.004
 205. Wu L, Chen L, Zhu L, Chen X, Li Q. Integrated assessment of biomarker responses and comparative toxicity pathway in snails *Bellamya aeruginosa* exposed to tributyltin and triphenyltin in sediments. *Environ Sci Eur*. (2020) 32:95. doi: 10.1186/s12302-020-00373-y
 206. Yu K, Geng X, Chen M, Zhang J, Wang B, Ilic K, et al. High daily dose and being a substrate of cytochrome P450 enzymes are two important predictors of drug-induced liver injury. *Drug Metab Dispos*. (2014) 42:744–50. doi: 10.1124/dmd.113.056267
 207. Kumar S. Plasma exosomes and drug metabolic cytochrome P450 enzymes. *J Drug Metab Toxicol*. (2015) 1–3. doi: 10.4172/2157-7609.1000e124
 208. Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J*. (2006) 8:E101–11. doi: 10.1208/aapsj080112
 209. Kroon F, Stretten C, Harries S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: a systematic review. Meador JB, éditeur. *PLoS ONE*. (2017) 12:e0174762. doi: 10.1371/journal.pone.0174762
 210. Goks A. Use of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl*. (1995) 17:80–95.
 211. Hong J-Y, Yang CS. Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity. *Environ Health Perspect*. (1997) 105:759. doi: 10.2307/3433280
 212. Bhutia D, Rai BK, Pal J. Hepatic cytochrome P450 as biomarkers of cypermethrin toxicity in freshwater teleost, *Channa punctatus* (Bloch). *Braz Arch Biol Technol*. (2014) 58:131–6. doi: 10.1590/S1516-8913201400049

213. Tabrez S, Ahmad M. Cytochrome P450 system as a toxicity biomarker of industrial wastewater in rat tissues. *Food Chem Toxicol.* (2010) 48:998–1001. doi: 10.1016/j.fct.2009.12.024
214. Fujita S, Chiba I, Ishizuka M, Hoshi H, Iwata H, Sakakibara A, et al. P450 in wild animals as a biomarker of environmental impact. *Biomarkers.* (2001) 6:19–25. doi: 10.1080/135475001452751
215. Ala-Korpela M, Davey Smith G. Metabolic profiling-multitude of technologies with great research potential, but (when) will translation emerge? *Int J Epidemiol.* (2016) 45:1311–8. doi: 10.1093/ije/dyw305
216. Harrigan CG, Goodacre R, éditeurs. *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis.* Boston, MA: Springer (2003). Available online at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0333-0> (accessed September 29, 2020).
217. Steuer AE, Brockbals L, Kraemer T. Metabolomic strategies in biomarker research-new approach for indirect identification of drug consumption and sample manipulation in clinical and forensic toxicology? *Front Chem.* (2019) 7:319. doi: 10.3389/fchem.2019.00319
218. Shah SH, Kraus WE, Newgard CB. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. *Circulation.* (2012) 126:1110–20. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060368
219. Wang P. Combined subchronic toxicity of dichlorvos with malathion or pirimicarb in mice liver and serum: a metabolomic study. *Food Chem Toxicol.* (2014) 70:222–30. doi: 10.1016/j.fct.2014.05.027
220. Deguchi H, Elias DJ, Trauger S, Zhang H-M, Kalisiak E, Siuzdak G, et al. Warfarin untargeted metabolomics study identifies novel procoagulant ethanamide plasma lipids. *Br J Haematol.* (2014) 165:409–12. doi: 10.1111/bjh.12720
221. Xu H-D, Wang J-S, Li M-H, Liu Y, Chen T, Jia A-Q. 1H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat Toxicol.* (2015) 159:69–80. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.11.020
222. Li L, Wang M, Chen S, Zhao W, Zhao Y, Wang X, et al. A urinary metabolomics analysis of long-term effect of acetochlor exposure on rats by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Pest Biochem Physiol.* (2016) 128:82–8. doi: 10.1016/j.pestbp.2015.09.013
223. Yan H, Qiao Z, Shen B, Xiang P, Shen M. Plasma metabolic profiling analysis of toxicity induced by brodifacoum using metabolomics coupled with multivariate data analysis. *Forensic Sci Int.* (2016) 267:129–35. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.08.027
224. World Health Organization, éditeur. *Genomics and World Health: Report of the Advisory Committee on Health Research.* Geneva: World Health Organization (2002). p. 241.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Rached, Moriceau, Serfaty, Lefebvre and Lattard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

L'analyse de la littérature disponible a donc montré une utilisation prépondérante de la lutte chimique contre les rongeurs nuisibles, via l'utilisation des rodenticides anticoagulants, des substances actives inhibant le recyclage de la vitamine K et conduisant ainsi à la mort des individus contaminés par épuisement des facteurs de coagulation actifs entraînant des hémorragies. L'usage massif de ces molécules, aussi bien en tant que biocides qu'en tant que produits phytopharmaceutiques, résulte en une forte prévalence de l'exposition de la faune non-cible, aussi bien domestique que sauvage, d'autant que les derniers AVK développés pour pallier à l'émergence de résistance chez les rongeurs-cibles (AVK de seconde génération) sont plus persistants dans les organismes, augmentant ainsi le risque d'exposition secondaire. Afin de caractériser au mieux le risque représenté par les AVK pour la faune non-cible, il est nécessaire de pouvoir évaluer leur toxicité sur ces organismes. Même si les signes cliniques classiquement entraînés par les AVK (hémorragies) sont un indicateur intéressant de leur effet, ils sont peu spécifiques et ne seront pas forcément observés, notamment dans le cas d'intoxications sub-cliniques. Il est donc nécessaire de s'intéresser à d'autres marqueurs, parmi lesquels les concentrations en AVK dans les tissus ou encore le dosage des vitamines de la vitamine K, qui sont explorés dans cette thèse.

III.OBJECTIFS DE LA THESE ET STRATEGIES MISES EN PLACE

La principale question de recherche de ce travail s'intéresse à la **distinction entre simple exposition environnementale de la faune non-cible aux rodenticides anticoagulants et réelle intoxication par ces molécules**. On a vu en effet dans la littérature explorée que l'exposition chez la faune non-cible était régulièrement détectée, et qu'il était donc nécessaire de caractériser au mieux le risque représenté par ces molécules sur les individus et les écosystèmes, pour pouvoir statuer de manière éclairée sur leur balance bénéfice/risque.

De cette thématique principale découlent des objectifs secondaires, donnant lieu à trois axes de travail qui sont les suivants :

- **La réalisation d'un bilan critique des marqueurs de la toxicité des AVK existants (axe 1) :**
L'exploration de la littérature disponible a montré qu'il n'existait que peu de ressources s'intéressant à l'exploration de la toxicité des rodenticides anticoagulants, au-delà de l'usage de marqueurs « classiques » comme le tableau clinique, l'exploration des temps de coagulation (notamment chez les animaux domestiques) ou encore la définition d'une valeur-seuil pour les concentrations en AVK dans les tissus. Il était donc nécessaire de faire un récapitulatif sur toutes les pistes existantes, qu'elles soient simplement à l'état d'expérimentation ou déjà bien développée.

- **L'étude sur le terrain de la pertinence de certains de ces marqueurs (axe 2) :**
Le travail de thèse a été réalisé en partenariat avec le Centre National d'Information Toxicologique vétérinaire (CNITV), ce qui a permis un accès à leur base de données des intoxications animales, mais également un lien direct avec le terrain pour pouvoir proposer la mise en place de protocoles d'étude suite à la remontée de suspicion d'intoxications. Afin de couvrir au maximum le spectre d'utilisation de ces marqueurs, il a été choisi de s'intéresser à leur pertinence :
 - dans le cadre d'intoxications primaires, suite à une exposition aux AVK chez la faune domestique ;
 - dans le cadre d'intoxications secondaires, en s'associant à la veille toxicologique réalisée par le CNITV sur les rapaces collectés en *post-mortem* dans le sud-est de la France.

➤ **L'initiation d'une réflexion sur l'usage de vitamines de la vitamine K comme biomarqueurs candidats de la toxicité des rodenticides anticoagulants (axe 3) :**

Au vue des mécanismes d'action des rodenticides anticoagulants, la vitamine K et ses vitamines sont apparus comme des biomarqueurs d'effet potentiels, mais peu explorés. Il a donc été décidé d'entamer un 3^{ème} axe de réflexion dans ce travail de thèse, servant à amorcer de futures recherches sur l'utilisation de la vitamine K comme marqueur de la toxicité des AVK.

L'organigramme de la Figure 12 présente les stratégies mises en place durant ce travail.

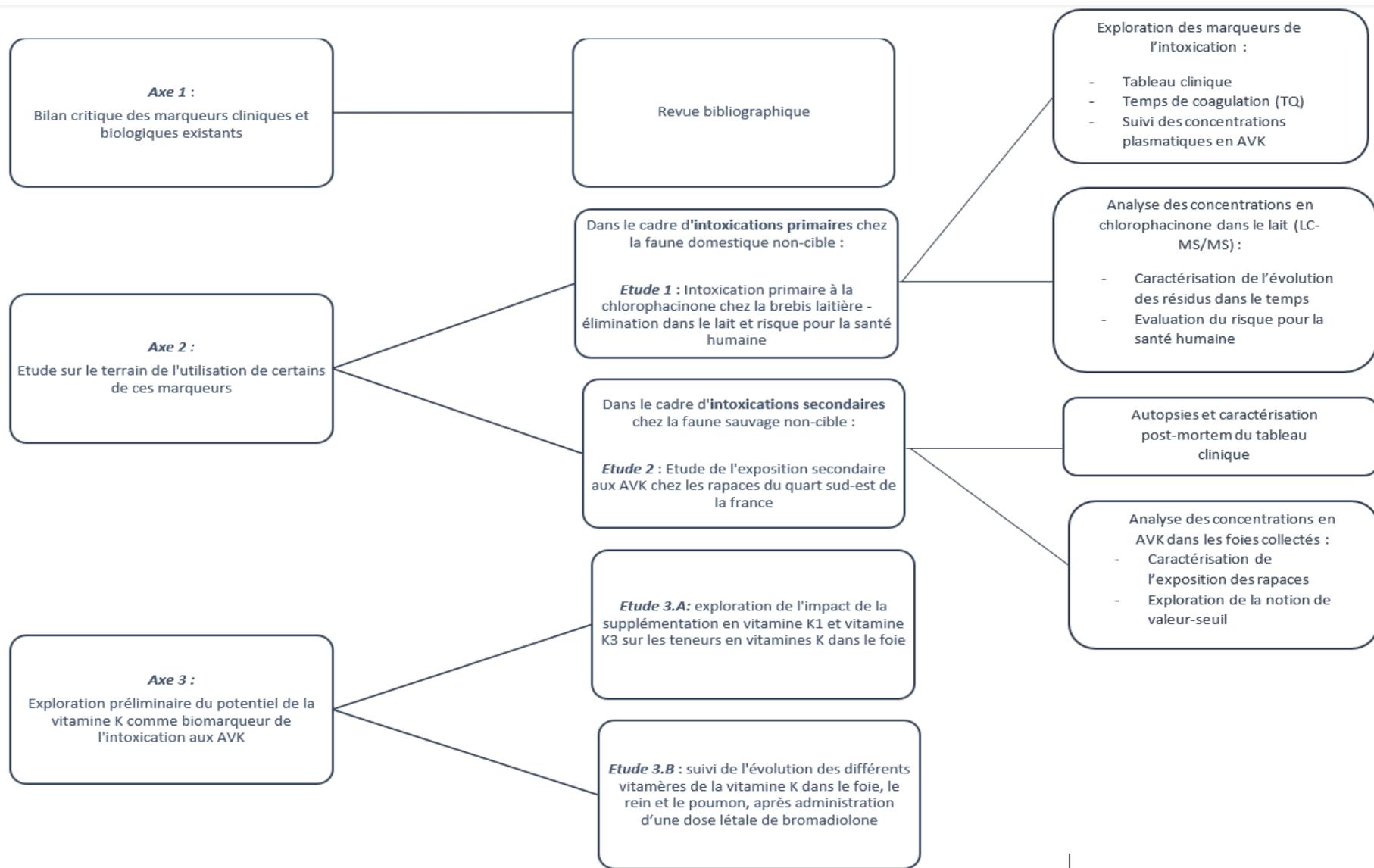


Figure 12 : Stratégies mises en place

IV.RESULTATS

IV.1. Etude d'une intoxication primaire chez des brebis laitières

Ce travail correspond à l'article 2 de la thèse, intitulé en anglais : « Accidental chlorophacinone exposure of lactating ewes: clinical follow-up and human health dietary implications ».

IV.1.1. Objectifs

Cette première étude fait suite à l'appel au CNITV d'un vétérinaire sollicité pour un troupeau de brebis laitières ayant consommé par accident un sac de blé enrobé de chlorophacinone. La question principale de l'éleveur et du vétérinaire ayant sollicité le conseil du centre antipoison concerne la contamination potentielle du lait des brebis par la chlorophacinone, et la définition d'un éventuel temps d'attente à appliquer avant de remettre le lait dans le circuit de la consommation. Les données sur le sujet étant maigres, il est décidé de mettre en place un protocole de suivi du troupeau afin de caractériser la cinétique d'excrétion de la chlorophacinone dans le lait, et ainsi d'estimer le risque de consommation pour l'Homme, mais également afin de caractériser la toxicité de la chlorophacinone pour les animaux non-cibles l'ayant consommée via un suivi clinique, une évaluation des temps de coagulation et un suivi des concentrations en AVK dans le plasma. Ce travail s'inscrit donc dans la démarche de réflexion de la thèse, s'intéressant aux marqueurs de la toxicité des AVK lors d'une intoxication primaire, chez la faune domestique.

IV.1.2. Méthodes

Tout le troupeau de brebis laitières (n = 23), de race Lacaune, est intégré dans l'étude. Ces brebis ont consommé un sac entier de 20 kg de grain contenant de la chlorophacinone à la concentration de 50 mg/kg (soit 1 g de chlorophacinone dans le sac), mais la distribution entre les individus est inconnue. Pour chaque brebis, des échantillons de lait sont collectés par l'éleveur de J2 (le J0 étant le jour de l'ingestion) à J7, et du sang est prélevé par le vétérinaire de l'élevage à J3, ainsi qu'à J11 pour les animaux qui avaient présenté un taux plasmatique de chlorophacinone supérieur à 100 ng/mL lors du premier prélèvement.

Les AVK sont extraits du lait et du plasma par une extraction liquide-liquide, suivie d'une analyse par LC-MS/MS, selon la méthode décrite par Fourel et al. (Fourel et al., 2017). Les limites de quantification (LOQ) sont de 0.1 ng/mL pour le lait et de 2 ng/mL pour le plasma. Le temps de Quick est également évalué sur les échantillons de sang collectés dans des tubes citratés (moyenne de 2 mesures par échantillon).

Une approche non-compartmentale est choisie pour les calculs pharmacocinétiques : les concentrations en chlorophacinone dans le lait sont utilisées pour estimer le taux d'élimination et la demi-vie. Ces données sont comparées à celles de la littérature concernant la toxicité de l'AVK chez l'Homme, afin d'estimer le risque de consommation du lait et un potentiel temps d'attente.

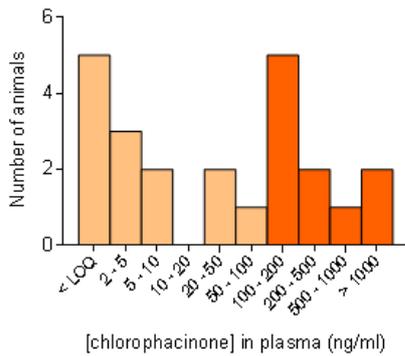
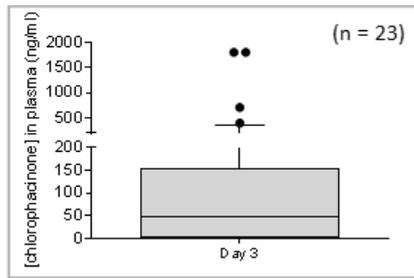
IV.1.3. Principaux résultats

IV.1.3.1. Evaluation de la toxicité de la chlorophacinone pour le troupeau

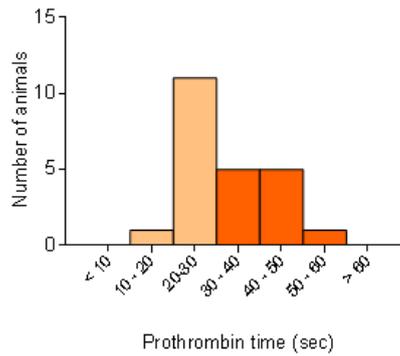
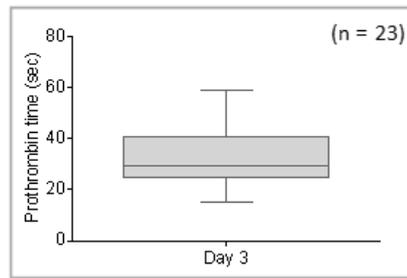
Dans le mois qui a suivi l'ingestion, aucune brebis n'a montré de signes cliniques de type hémorragique, ni même aucun autre signe moins spécifique. La chlorophacinone était pourtant détectable dans le plasma de 18 d'entre elles à J3 (78,3%), dont 3 présentaient des concentrations très élevées au-dessus de 500 ng/mL (Figure 13A) . Pour les 10 animaux testés à J11, les concentrations plasmatiques en chlorophacinone était significativement inférieures à celles retrouvées à J3 (t-test apparié, $p = 0.0256$), avec des valeurs comprises entre 2,01 et 16,37 ng/mL (Figure 13C).

Les TQ mesurés à J3 étaient compris dans l'intervalle 15-60 sec (Figure 13D), avec une différence significative entre les brebis ayant une concentration plasmatique en chlorophacinone non quantifiable (assignée à la LOQ, $n = 5$) et celles présentant une concentration plasmatique supérieure à 50 ng/mL ($n = 18$)(test de Tukey, $p = 0.025$). Ainsi le TQ moyen chez les individus présentant des concentrations plasmatiques entre 50 et 500 ng/mL était augmenté de 137%, et de 185% chez les individus présentant des concentrations >500 ng/mL. Cependant, aucune corrélation linéaire n'a pu être déterminée entre concentrations plasmatiques (et dans le lait) en chlorophacinone et TQ (Figure 14).

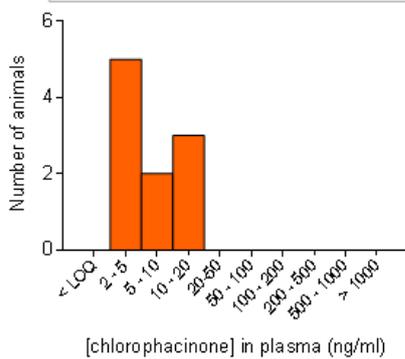
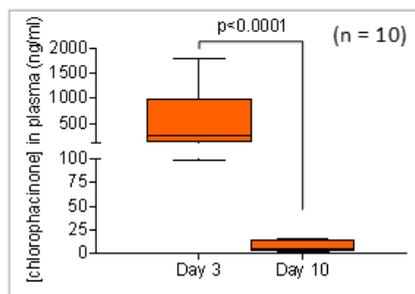
A/



B/



C/



D/

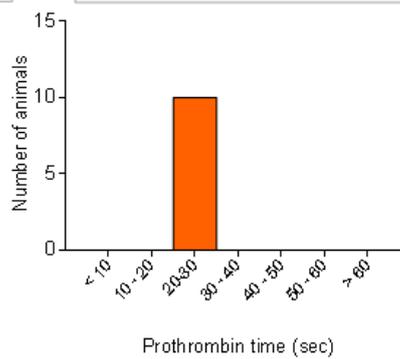
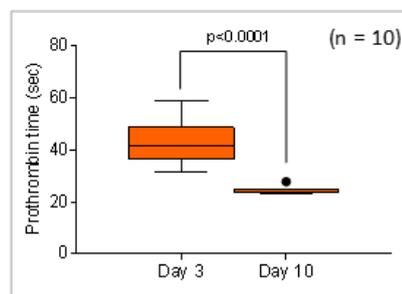


Figure 13: Distribution des concentrations en chlorophacinone dans le plasma et TQ à J3 et J11.

A/Boxplot et distribution de la chlorophacinone dans le plasma à J3

B/Boxplot et distribution du TQ à J3

C/Boxplot et comparaison des concentrations plasmatiques en chlorophacinone à J3 et J11. Distribution des concentrations plasmatiques en chlorophacinone à J11.

D/ Boxplot et comparaison des TQ à J3 et J11. Distribution du TQ à J11.

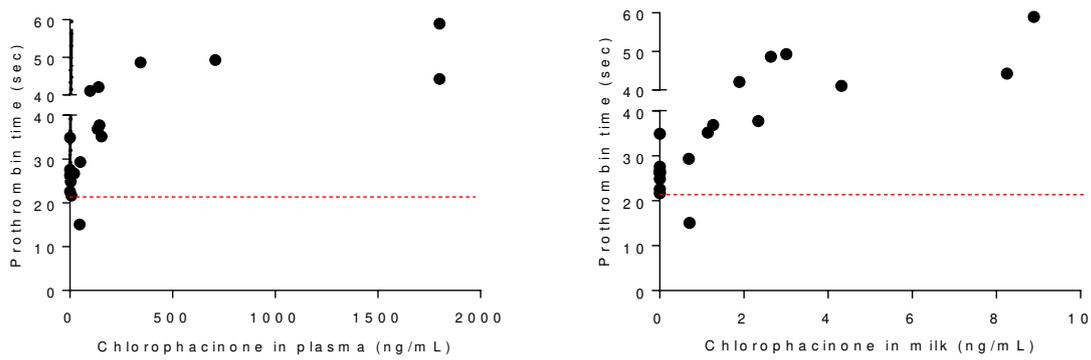


Figure 14 : Evolution du TQ en fonction de la concentration en chlorophacinone dans le plasma (gauche) et le lait (droite)

IV.1.3.2. Caractérisation de la cinétique d'élimination dans le lait et risque pour la santé humaine

Des résidus de chlorophacinone ont pu être quantifiés dans le lait de 12 des brebis tout le long de la période de prélèvements, de J2 à J7 (Tableau 5). Deux individus ont été écartés des analyses pharmacocinétiques, car présentant des valeurs aberrantes à J4. Pour les 10 restantes, une régression linéaire a permis d'estimer une demi-vie d'élimination de la chlorophacinone dans le lait, de l'ordre de 48h (Figure 15), et d'estimer les concentrations initiales dans le lait de ces individus, variant entre 1.60 et 30.12ng/mL. Une corrélation significative a été démontrée entre les concentrations en chlorophacinone dans le plasma et dans le lait ($R^2 = 0.9603$, $p = 0.002$), suggérant un transfert dose-dépendant.

Tableau 5 : Concentrations en chlorophacinone dans le lait

Jour post-exposition	2	3	4	5	6	7
Animaux avec des quantités quantifiables de chlorophacinone dans le lait^a						
Nombre d'animaux	13	12	12	12	12	12
[chlorophacinone] dans le lait (ng/ml)	3.84 [0.40-11.50]	3.37 [0.69-8.89]	2.57 [0.39-6.91]	1.53 [0.36-3.52]	1.08 [0.28-2.41]	0.37 [0.13-0.90]
Troupeau (n=23)^b						
[chlorophacinone] dans le lait (ng/ml)	2.17-2.22 [LOQ-11.50]	1.76-1.80 [LOQ-8.89]	1.45-1.50 [LOQ-6.91]	0.80-0.85 [LOQ-3.52]	0.57-0.61 [LOQ-2.41]	0.19-0.24 [LOQ-0.90]

- Les valeurs correspondent à la moyenne et à l'[intervalle des concentrations] retrouvées dans le lait, chez les individus présentant des concentrations > LOQ.
- Les valeurs correspondent à la moyenne de Kaplan-Meier (valeurs assignées pour la LOQ : LOQmin = 0,001 ng/mL, LOQmax = LOQ = 0,1 ng/mL) et à l'[intervalle des concentrations] retrouvées dans le lait, pour l'ensemble du troupeau.

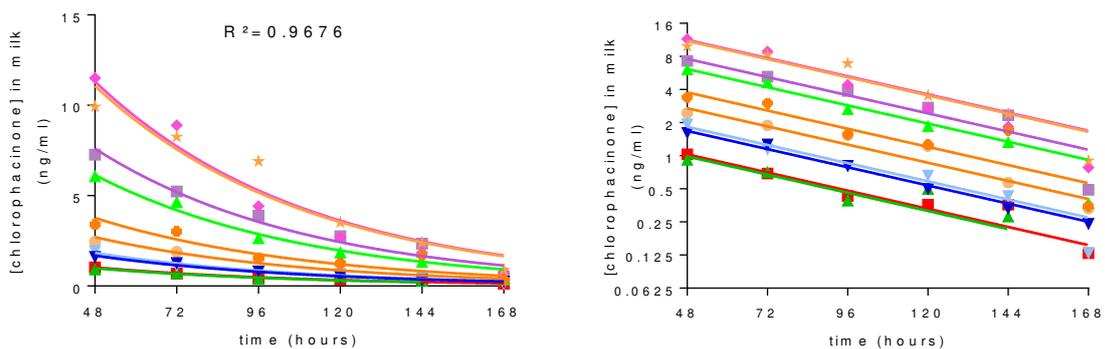


Figure 15 : Evolution des concentrations en chlorophacinone dans le lait en fonction du temps (Kel moyen = 0.01489 - n = 10)

La concentration moyenne en chlorophacinone dans le lait pour l'intégralité du troupeau (n = 23) a également été calculée (Tableau 5), afin de représenter le niveau attendu de résidus dans le tank, et ainsi d'estimer un temps d'attente pour le lait du tank. En utilisant une consommation journalière de 1,5 L de lait chez un individu de 60 kg (valeur du « panier de la ménagère » préconisée par l'OMS), et une dose de 0,0010 mg/jour (soit comme dose journalière admissible (DJA – calculée avec une approche très conservatrice à partir de la dose sans effet adverse observé [NOAEL] de la chlorophacinone chez le rat, i.e. 0,005 mg/kg/jour sur 90 jours, affectée d'un facteur conservateur d'extrapolation de 300), la concentration moyenne en chlorophacinone dans le lait du tank passerait sous la DJA au bout de 6 jours, ce qui correspond au temps durant lequel le lait devrait être écarté. Cela demeure cependant une estimation approximative, basée sur un échantillon faible, et mérite d'être pris avec précaution.

Article 2 :

Accidental chlorophacinone exposure of lactating ewes: clinical follow-up and human health dietary implications

Meg-Anne Moriceau (1,2), Sébastien Lefebvre (1), Isabelle Fourel (1), Etienne Benoit (1), Barnett A. Rattner (3), Virginie Lattard (1)*

1- USC1233 RS2GP, INRA, VetAgro Sup, Univ Lyon, F69 280 Marcy-l'Étoile, FR

2- CNITV, VetAgro Sup, 1 avenue Bourgelat, 69 280 Marcy-l'Étoile, FR

3- U.S. Geological Survey, Patuxent Wildlife Research Center, Beltsville, MD 20705,
USA

*Corresponding author: Virginie Lattard

USC1233 INRA-Vetagro Sup 69280 Marcy l'Etoile, France

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

Citation : Moriceau, M.-A., Lefebvre, S., Fourel, I., Benoit, E., Rattner, B.A., Lattard, V., 2020. Accidental chlorophacinone exposure of lactating ewes: Clinical follow-up and human health dietary implications. Food Chem. Toxicol. 143, 111518. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111518>

ABSTRACT

Anticoagulant rodenticides are widely used for rodent control in agricultural and urban settings. Their intense use can sometimes result in accidental exposure and even poisoning of livestock. Can milk, eggs or meat derived from such accidentally exposed animals be consumed by humans? Data on the pharmacokinetics of chlorophacinone in milk of accidentally exposed ewes were used to estimate the risk associated with its consumption. Three days after accidental ingestion, chlorophacinone was detected in plasma of 18 ewes, with concentrations exceeding 100 ng/mL in 11 animals. Chlorophacinone was detected in milk on day 2 post-exposure and remained quantifiable for at least 7 days in milk of these 11 ewes. Concentrations in milk were much lower than in plasma and decreased quickly (mean half-life of 2 days). This study demonstrated dose-dependent mammary transfer of ingested chlorophacinone. Variation in prothrombin time (PT) on Day 3 suggested that some of the ewes that ingested chlorophacinone may have been adversely affected, but PT did not facilitate estimation of the quantity of chlorophacinone consumed. Using safety factors described in the literature, human health concern related to the consumption of the milk from these dairy ewes seemed low.

Keywords: *chlorophacinone residues, food safety, intoxication, mammary transfer, prothrombin time, sheep, ewes, Ovis aries*

1 INTRODUCTION

Anticoagulant rodenticides (ARs) are widely used for pest control in urban and agricultural settings (Jacob and Buckle 2018). They disrupt the vitamin K cycle, antagonizing vitamin K epoxide reductase in liver and other tissues (Li et al. 2004; Rost et al. 2004), and thus interfere with the synthesis of active forms of blood clotting factors II, VII, IX and X. Their action results in coagulopathy that can lead to death of target rodents in several days (Murphy, 2002).

As these products are widely used, they are all too frequently involved in domestic animal poisoning, especially in dogs (*Canis lupus familiaris*). For example, the National Centre for Veterinary Toxicological Information data from 2007 to 2017 (CNITV – Lyon, France) indicate that ARs are the main category of potential poisoning incident calls among all pesticides (40.4%), with dogs being 82.8% of incidents (Lefebvre et al. 2017a). Ruminants are apparently less often exposed than other domestic species (only 2.2% of calls about rodenticide poisoning are for ruminants), and display clinical signs less frequently (only 10.5% of exposed animals displaying clinical signs according to CNITV data). This decreased incidence of clinical signs is possibly due to a lower sensitivity to ARs (Berny et al. 2006).

Clinical signs of rodenticide intoxication are similar for higher vertebrate species: hemorrhagic syndrome, with main localizations being respiratory and digestive tract, and less specific symptoms including lethargy, anorexia, or ataxia (Berry et al. 1993; Sheafor and Couto 1999; Murphy 2002; Waddell et al. 2013). Clinical onset is usually delayed from 2 to 10 days post-ingestion (Lefebvre et al. 2017a; Berny et al. 2005). No simple and definitive diagnostic procedures are available, and clinical suspicion is based on coagulation testing by measuring prothrombin time (PT) which is the clinical standard for diagnosis of AR intoxication (Murphy 2002; Woody et al. 1992; Lefebvre et al. 2017b). Exposure can be definitively assessed by concentration of the ARs in liver and plasma (Lefebvre et al. 2017a).

Another issue with ARs lies in the dairy production field, as they undergo mammary transfer (Martin et al. 1991). Residues can be found in the milk of an exposed and potentially intoxicated dairy animal, resulting in human exposure to ARs. The milk transfer rate of ARs in lactating animals has not been adequately documented in the literature, although it is mentioned in some older studies investigating the risks of vampire bat (*Desmodus rotundus*) mitigation campaigns in Latin America involving intraruminal injection of ARs in cattle (*Bos taurus*) (Thompson et al. 1972; Bullard et al. 1977). Many older publications report dose-dependent effects related to AR transfer through milk. For example, administration of massive doses of dicoumarol (Field 1945) or warfarin (Blumberg et al. 1960) to lactating rats (Carworth Farm albino rats - *Rattus norvegicus domestica*) produced hypoprothrombinemia in suckling young. Administration of diphenadione (i.e., diphacinone) to lactating cows resulted in increased PT in suckling calves (Elias et al. 1978). Investigations have also been conducted in lactating women receiving anticoagulant drugs, allowing study of the effects of anticoagulant therapy on breastfed infants (Brambel and Hunter 1950; Fries et al. 1957; O'Reilly and Aggeler 1970); these children were usually asymptomatic (Brambel and Hunter, 1950; Fries et al. 1957), with no residues of the drug in their mother's milk (O'Reilly and Aggeler 1970).

As there is no established Maximum Residue Limit (MRL) for these products in animal tissues, no withdrawal period has been defined. This brings into question the safety of dairy products for human consumption in suspect dairy livestock exposure incidents. Chlorophacinone (CAS number: 3691-35-8) is a first-generation AR, derived from indanedione. In Europe this product is no longer used as a plant protection agent but is still approved as a biocide (EU regulation n°528/2012) for control of pest rodents (e.g., brown rat, *Rattus norvegicus*; Black rat, *R. rattus*; house mouse, *Mus musculus*). It can be hazardous for

domestic animals (ACTA, 2018; Standing committee on Biocidal Products, 2009), and to a lesser degree a public health issue if accidentally ingested by dairy animals. Herein we report results of an investigation on the pharmacokinetics of chlorophacinone in milk of accidentally exposed dairy ewes to estimate the risk associated with its consumption by humans.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animal population, case history

In May 2017, a flock of 23 healthy Lacaune adult lactating ewes (*Ovis aries*), of standard weight for the breed (70-80kg), from a farm of the french department of Creuse (23), accidentally ingested an entire 20-kg bag of grain bait (ROZOL GRAIN'TECH - Liphatech SAS) containing 50 mg/kg of chlorophacinone (*i.e.* 1 g of chlorophacinone in total). Exposure distribution among the flock was obviously unknown. A veterinarian was contacted about 12 hours post-ingestion, and all animals were asymptomatic at that time.

2.2 Samples

For each animal, milk and blood samples were collected. Milk was obtained daily in dry tubes by the farmer from days 2 to day 7 post-ingestion. Whole blood was drawn by the attending veterinarian from the jugular vein into 10-mL tubes containing citrate on day 3 post-ingestion from all animals, and on day 11 from the subset of animals with plasma chlorophacinone concentration >100 ng/mL in the first blood sample.

2.3 Determination of AR concentrations in plasma and milk

Liquid-Liquid Extraction (LLE) was used to extract ARs from plasma and milk of the sheep. Briefly, 200 μ L of blood plasma was homogenized with 4mL of acetone using a rotator for 10 min. The mixture was centrifuged for 5 min. The liquid fraction was separated and evaporated to dryness at 40°C under a gentle stream of nitrogen. The residues were reconstituted and mixed in 0.2 mL of acetonitrile. For milk, 1 mL was homogenized with 4 mL of acetone using

a rotator for 30 min. The mixture was centrifuged for 5 min. The liquid fraction was separated and evaporated to dryness at 40°C under a gentle stream of nitrogen. The residues were resuspended in 4 mL of acetone using a rotator for 10 min, then centrifuged (2000g) for 5 min. The supernatant was resuspended in 200 µl of acetonitrile, vortexed for 10 seconds, then placed in an ultrasonic tank for 5 min and again vortexed for 10 seconds. In order to freeze the lipidic portion, the sample was placed in the freezer for about 10 min. The supernatant was recovered and purified through a 0.2 µm filter.

AR residue analysis was carried out by using the LC-MS/MS method previously described (Fourel et al. 2017). The ARs analysed with this method are three first-generation ARs: warfarin, coumatetralyl, chlorophacinone and five second-generation ARs potentially used in European countries: bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen and difethialone. The chromatographic separation was achieved with a semi-porous Poroshell 120 StableBond C18 column (2.1x100mm, 2.7µm) and MS/MS detection was carried out by a 6410B Triple Quadrupole from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with ElectroSpray Ionization source in negative mode. Two fragment ions were recorded in dynamic Multiple Reaction Monitoring mode for each analyte. Limits of quantification (LOQ) were 0.1 ng/mL for milk and 2 ng/mL for plasma.

2.4 Prothrombin time determination

Blood samples were collected into citrated tubes, then centrifuged at 2000 g for 10 min. The PT (in seconds) was assessed in duplicate using a Biomerieux Option 2 Plus (Behnk Electronick, Norderstedt, Germany) with the Neoplastin CI, INR Determination kit (Diagnostica Stago, Asniere, France). The PT was determined in 100 µl samples of plasma with thromboplastin, according to the manufacturer's instructions. Each value was the mean of 2 measurements.

2.5 Data analysis

Statistical analyses were also performed using GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla CA, USA) and SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Pharmacokinetic calculations were performed using the noncompartmental approach. Chlorophacinone concentrations in milk were used to estimate the elimination rate constant and half-life from daily samples collected between 48 and 168 h post-exposure, except for one animal having a concentration below the LOQ for the 168-h time point. The half-life of elimination ($t_{1/2(el)}$) was calculated using a linear regression.

For residues in milk (< 50% of samples under the LOQ), the Kaplan-Meier method was used to estimate the extremes of the mean in the whole flock (Helsel, 2005). Lowest bound was calculated replacing values under the LOQ by 0.001 ng/mL, while highest bound was obtained by replacing those values by the value of the LOQ (i.e. 0.1 ng/mL).

3 RESULTS

3.1 Clinical description of the flock

None of the ewes exhibited overt signs of intoxication at the time accidental chlorophacinone exposure was discovered. Vitamin K1 was not administered, and in the month following ingestion no clinical signs appeared in any of the animals.

3.2 Post-exposure measurements during week 1

On day 3 post-exposure, chlorophacinone was detected at quantifiable concentrations (LOQ = 2 ng/ml) in plasma of 18 of the 23 ewes (78.3%). Plasma concentrations (median = 47.6 ng/mL) are presented in Figure 1A. Seven ewes had plasma chlorophacinone concentrations >LOQ to ≤ 50 ng/mL, and 8 were between >50 and 500 ng/mL. Three ewes had plasma levels >500 ng/mL, with a maximum concentration of 1800 ng/mL found in 2 animals.

On day 3 post-exposure, PT was determined for each animal (Figure 1B). Median value in the flock was 29.3 sec, and all values were within 15-60 sec. Clotting time was compared among groups of ewes with plasma chlorophacinone concentrations assigned the LOQ or in the ranges of >LOQ to 50 ng/mL, >50 to 500 ng/mL, and >500 ng/mL, and differences were apparent (analysis of variance $F_{3,19}=23.08$, $p<0.0001$). On day 3, ewes with plasma chlorophacinone >50 ng/mL exhibited prolonged PT (Tukey's honestly significant difference, $p=0.025$) compared to those with plasma chlorophacinone assigned the LOQ (Table 1).

Chlorophacinone was detected at quantifiable concentrations in milk in 13 of 18 animals sampled on day 2 and remained quantifiable in 12 of these animals for 5 additional days (Table 2). For these 12 animals, the mean chlorophacinone value in milk on day 3 was 3.37 ng/mL, and all values were ≤ 8.9 ng/mL. Notably, for these 12 animals, plasma concentrations were near or >50 ng/mL (one individual at 47.59 ng/mL) on day 3. In milk of the other 11 animals, chlorophacinone was not detected or detected at concentrations ≤ 1 ng/mL on day 3. The frequency distribution of chlorophacinone concentration in milk of all ewes on day 3 is presented in Figure 2. Seven days after accidental exposure, chlorophacinone concentration in milk of all animals was <1 ng/mL.

3.3 Post-exposure measurements day 11

On day 11 (i.e., 8 days after the initial sample collection), chlorophacinone concentration was measured in plasma of 10 animals that exhibited concentrations ≥ 100 ng/mL on day 3 post-exposure. Values ranged from 2.01 to 16.37 ng/mL (Figure 1C) and were significantly lower (paired t -test, $p = 0.0256$) than those collected on day 3. For each individual, the remaining fraction of initial plasma concentration varied between 0.80 and 4.12%, with a mean value of 1.93% (SD = 0.99).

Prothrombin time values in the samples collected 11 days after chlorophacinone ingestion were distributed in a narrow range (23.2-27.85 sec), with a mean value of 24.25 sec (SD: 0.44) (Figure 1D), and did not differ from PT values of the 10 of 23 animals with plasma chlorophacinone concentration below 10 ng/mL on day 3 (i.e., animals with low exposure to chlorophacinone on day 3)(unpaired *t*-test, *p*=0.58).

3.4 Pharmacokinetics of chlorophacinone in milk

Chlorophacinone was quantifiable in milk of 12 ewes from days 2 through 7. Two ewes exhibited an unexpected increase of concentration of chlorophacinone in milk on day 4 and those animals were excluded from pharmacokinetic calculations (Figure 3). Using simple regression modelling of chlorophacinone elimination from milk, elimination half-life for each animal was estimated (mean $t_{1/2}$ = 48 hours) (Table 3). Extrapolated initial concentrations in milk varied between 1.60 and 30.12 ng/mL (Table 2). Kinetics were similar for all tested animals (Figure 3 – right: mean K_{el} = 0.01489; $R^2=0.9676$) over a wide range of initial concentrations in plasma and milk.

3.5 Relationship between chlorophacinone concentration in plasma and milk

A positive relation between the residues in the plasma and the milk was observed, as determined by linear regression ($R^2 = 0.9603$, $p = 0.002$; Figure 4). Such a correlation suggests a dose-dependent mammary transfer.

4. DISCUSSION

4.1 Chlorophacinone transfer in milk

As previously reported in the literature (Martin et al. 1991), our findings demonstrate mammary transfer of ingested chlorophacinone to milk. However, transfer seems very limited. Indeed, only a small fraction of the chlorophacinone in plasma was found in milk, with proportions varying between 0.8 and 4.1%. Three days after accidental chlorophacinone ingestion, concentrations in milk were very low (<15 ng/ml) while plasma concentrations remained high (ranging up to 1800 ng/mL). Seven days after chlorophacinone ingestion, concentrations in milk were <1 ng/mL.

It should be noted that 2 ewes exhibited an unexpected increase in chlorophacinone concentration in milk on day 4. Two hypotheses might explain such elevated values: (i) possible new exposure, or (ii) a delay in absorption of chlorophacinone from the digestive tract of those two animals. A larger-scale study would be necessary to more fully examine inter-individual variability.

This mammary transfer appears to be dose-dependent, as suggested by the positive relation between the residues in plasma and milk (Figure 4). This same dose-dependent transfer has been observed in cows intra-ruminally treated with another AR, diphenadione (i.e., diphacinone) (Bullard et al. 1977). Proportions of mean quantifiable plasma to milk concentrations in cows, calculated from the data provided at each time point, varied between 0.5 to 1%, a rate similar to that estimated in the present study.

One of the limitations of the present accidental exposure event was that the quantity of chlorophacinone ingested by each animal was unknown. It would be interesting to explore the possible relation between ingested amounts of chlorophacinone and concentrations in milk. The total ingested quantity of chlorophacinone was 1 g, and based on plasma concentrations

at day 3, only 10 animals had values above 100 ng/mL, suggesting a significant quantity of chlorophacinone was ingested by those animals. Assuming that all of the AR was ingested by those 10 ewes, and was distributed equally among them, the dose per animal would be 1.4 mg/kg BW (using a standard weight of 70 kg). For sheep treated intra-uminally with 1mg chlorophacinone/kg BW (Berny et al. 2006), mean plasma concentration after 72 hours was about 1000 ng/mL. In the present accidental exposure event, if in fact 1 g was ingested by only 10 ewes, the observed plasma concentrations at 72 h post-exposure (range 100 to 1800ng/mL, mean = 570 ng/mL) were within the range of values reported by Berny and coworkers (2006). Thus, the present hypothesis of a mean ingested amount of 1.4 mg/kg BW per animal seems reasonable, corresponding to a consumption of 98 mg per animal for a standard 70-kg ewe. In the present study, mean extrapolated initial concentration (C_o) in milk is 10.53 ng/mL. Assuming that daily milk production for a ewe is about 1.5L, at day 1 each animal would have 0.016 mg ($C_o \times$ milk production) of chlorophacinone in its milk. Assuming that all chlorophacinone was transferred into milk in 24 hours, this amount represents 0.00016% of the ingested quantity. Thus, only a small fraction of ingested AR undergoes mammary transfer.

4.2 Milk residues of chlorophacinone and human health issues

There is no MRL defined for ARs in feed, and only limited data are available regarding the toxicity of chlorophacinone in humans (Standing Committee on Biocidal Products, 2009). Data from literature indicate that acute ingestion of between 100 mg and 250 mg of chlorophacinone causes prolonged clotting time in adults, but these dosages are only based on a few clinical cases (O'Reilly and Aggeler 1970; Pitt et al. 2011). Using these data for prolonged clotting time, we attempted to estimate the human health risk associated with consumption of milk produced by the exposed ewes.

Notably, risk estimations have been conducted for diphenadione (i.e., diphacinone; Bullard et al. 1977; Pitt et al. 2011) that was used both as an AR and as a therapeutic agent in man, with a dosage between 2.5 and 30mg per individual. It was estimated that an adult human would have to drink about 115L of milk containing the maximal quantity found in milk of ewes orally administered with 2.75 mg/kg BW of diphenadione (i.e., diphacinone, 21 ng/mL), to reach the therapeutic dosage of 2.5 mg (Bullard et al. 1977). However, such data are not available for chlorophacinone, making extrapolation challenging. A safety factor of 1000 was used to extrapolate the human health risk associated with consumption of game animals containing diphacinone employing toxicity data in rats (Pitt et al. 2011). If such a safety factor is applied to the LD50 of chlorophacinone in rats (3.15 mg/kg BW; ACTA 2018), a dose with unacceptable risk for humans would be 0.003 mg/kg BW (i.e., 0.18 mg of chlorophacinone for a standard adult of 60 kg). The maximal concentration of chlorophacinone found in milk in our study was 12 ng/mL on day 2 post-ingestion (Figure 2). If this chlorophacinone concentration in milk is used to assess the human health risk associated with consumption, one standard adult would have to drink 14.3L of milk to reach this dosage, or eat 2.4 kg of ewe cheese [(as 6 L of milk are needed to make 1kg of cheese; this assumes that the AR would not affect the coagulation properties of milk, which may not be the case (Ibrahim and Tse 2018) and that cheese formation would not affect AR concentration]. To provide even a more accurate estimate, one should use the concentration found in the entire milk tank (i.e., a mixture of milk from all 23 ewes) rather than the greatest value found in a single animal at the beginning of the accidental exposure period. While this approach uses a large safety factor, risk assessments based solely on LD50 are not robust.

Another study presented the use of a safety factor of 300 to calculate the human health risk from the NOAEL of chlorophacinone after repeated oral exposure in rats (i.e., 0.005mg/kg BW/day for 90 days; Standing committee on biocidal products, 2009). Using this

factor, a standard adult weighing 60 kg would have to ingest 0.0010 mg/day, which corresponds to a daily consumption of 0.09L of the most contaminated milk or 17 g of cheese. Taking the regular safety factor generally used to calculate the Acceptable Daily Intake (ADI) of chemicals in feed (i.e., 100), exceedance would require more than 0.27L of milk or 51g of cheese daily for a standard adult. Such estimations are a “worst-case scenario” that do not take into account previously described considerations (i.e., dilution in the tank by the addition of milk from unexposed ewes and declining chlorophacinone concentrations related to its ~2 day elimination half-life in exposed ewes). If applying this same worst-case scenario at day 7 post-ingestion (with maximal measured concentration of 0.9 ng/mL), a standard adult could drink up to 1.1 L of the most contaminated milk daily for 90 days without exceeding the estimated ADI.

To obtain a more conservative estimate, this approach could be applied to the mean chlorophacinone concentration in milk from the entire flock (n=23) at day 2 post-ingestion (i.e., 2.2 ng/mL). In this scenario, using a safety factor of 300, a standard adult weighing 60 kg (CVMP 2018) could consume 0.45 L of milk or 76 g of cheese daily, and three times those quantities if using a safety factor of 100.

In this more realistic scenario, it is possible to estimate the “withdrawal period” for the milk from the entire flock (exposed and unexposed individuals) that was mixed in the tank. According to WHO’s model food basket (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2006), an adult consumes 1.5L of milk daily. Taking the dose of 0.0010 mg/day as a reference for the Acceptable Daily Intake (ADI), the “maximal residue limit” would be 0.7 ng/mL. According to Table 2, using the Kaplan-Meier method, the mean chlorophacinone concentration in the tank would be under this value at day 6. It is to be noted that this estimation is liberally adapted from the reference method to establish MRLs for veterinary drugs, and provided results are only rough estimations.

Thus, even in the worst-case scenario, the human health concern for consumption of chlorophacinone contaminated dairy products seems low. Still, this study is only a case report based on a small sample size, and not a robust controlled blinded study. It should be viewed as a preliminary risk assessment, and may only be valid for chlorophacinone.

4.3 Using clinical parameters to estimate residues levels in milk?

4.3.1 Species sensitivity to chlorophacinone intoxication

During the study, and in the absence of vitamin K1 administration, none of the ewes exposed to the AR chlorophacinone displayed overt clinical signs, even those with highest plasma levels. Those observations are in line with a suspected lack of sensitivity of ruminants to AR intoxication, as described in literature. For example, cattle experimentally administered doses up to 5 mg/kg BW of diphenadione (i.e., diphacinone) did not display any clinical signs (Bullard et al. 1977; Thompson et al. 1972), and Texel sheep orally administered 1 mg/kg BW of chlorophacinone did not display overt signs of intoxication, but did exhibit a slight increase of bleeding time at the venipuncture site (Berny et al, 2006).

These findings are corroborated by statistics from the French National Center for Veterinary Toxicological Information (CNITV). Between 2007 to 2017, this poison call-center received 398 calls about possible or probable intoxications with AR in ruminants (cattle, goats, sheep - i.e., 2.2% of the calls regarding this category of biocide). Total number of exposed animals was 2,043 individuals, and only 216 of them (i.e. 10.5%), displayed clinical signs, without further details on the severity of those signs. This presumed lack of sensitivity could be related to a dilution effect in the rumen, endogenous production of vitamin K1 in the rumen, or dietary vitamin K in their feed composed of leafy greens. Thus, overt symptoms do not seem to be a good indicator of the quantity of AR ingested in ruminants.

4.3.2 *Evaluation of the relationship between PT and residues in plasma and milk*

An increase in PT was observed in some of the “exposed” ewes (plasma chlorophacinone concentration >LOQ: mean PT value = 34.1 sec, n = 18 animals) when compared to “seemingly unexposed” individuals (assigned LOQ: mean PT value = 27.45 sec, n = 5 animals). Mean clotting time on day 3 increased by about 137% in ewes with plasma chlorophacinone between >50 to 500 ng/mL, and by about 185% in animals with plasma chlorophacinone >500 ng/mL. This variation is similar to the one observed in cattle (Bullard et al. 1977; Thompson et al. 1972), sheep (Berny et al. 2006) or goats receiving pindone (Martin et al. 1991). In the study by Berny and coworkers (2006), baseline PT was around 13.25 sec (SD = 0.52), increasing up to 27 to 40.7 sec after administration of the AR. No definitive reference baseline value could be found for PT in sheep, and values may differ among breeds and the analytical method used (Foley et al. 2014). Median values found in the literature varied from 7.31 sec (Leite Carlos et al. 2017 – n = 20 “mixed breed” ewes) to 40 sec (Siller-Matula et al. 2008 – n = 6 Austrian Mountain ewes). In our study, a control group (known to be unexposed) would have permitted determination of a baseline value for the breed. However, the mean PT value of “unexposed” animals is a good proxy of such a reference value.

Despite the observed increase, no simple linear relation exists between PT and concentrations of chlorophacinone in plasma and milk (Figure 5), but a “threshold-level effect” is seemingly apparent on day 3 at plasma concentrations >50 ng/mL and milk concentrations >2 ng/mL. Thus, while PT can serve as an indicator of exposure and adverse AR effects, it cannot be used to predict the residue levels in the milk of dairy animals intoxicated with chlorophacinone, highlighting the need for better indicators of exposure.

5 CONCLUSION

This study demonstrates minimal mammary transfer of ingested chlorophacinone in accidentally-exposed ewes, and seemingly low risk for consumers of their dairy products after a one-week withdrawal period. Based on plasma chlorophacinone levels, transfer to milk is dose-dependent and suggests that milk could serve as a non-invasive proxy for AR exposure. However, clinical markers used for routine monitoring in animals (overt signs of intoxication, changes in PT) did not seem to permit estimation of the magnitude of the primary exposure of ewes, and therefore the potential risk related to consumption of their dairy products.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr Anne-Marie JACQUES, pharmacokinetics expert at the Anses-ANMV, and Dr Thierry GODARD, toxicological expert at the Anses-ANMV, for their mindful review of this publication. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Any use of trade, product or firm names is for descriptive purposes only and does not imply endorsement by the U.S. Government. The contribution of Barnett Rattner to this study was supported by the Contaminant Biology Program of the U.S. Geological Survey Environmental Health Mission Area.

7 REFERENCES

- ACTA. 2018. Index acta phytosanitaire 54ème édition. Acta éditions. p.621.
- Berny, P., Alves, L., Simon, V., Rossi, S., 2005. Intoxication des ruminants par les Araticides anticoagulants : quelle réalité? *Rev. Med. Vet.* 156, 449-454.
- Berny, P.J., Alves de Oliveira, L., Videmann, B., Rossi, S. 2006. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of ARs in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 67, 363-371.
- Berry, C.R., Gallaway, A., Thrall, D.E., Carlisle, C. 1993. Thoracic radiographic features of anticoagulant rodenticide toxicity in fourteen dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound.* 34, 391-396.
- Blumberg, H., Dayton, H.B., Gordon, S.M., 1960. Effect of warfarin (coumadin) sodium administration during lactation on blood coagulation of nursing rats. *Exp. Biol. Med.* 105, 35-38.
- Brambel, C.E., Hunter, R.E. 1950. Effect of dicumarol on the nursing infant. *Am. J. Obst. Gyn.* 59, 1153-1159.
- Bullard, R.W., Thompson RD, Kilburn SR. 1977. Diphenadione residues in milk of cattle. *J. Agric. Food. Chem.* 25, 79-81.
- Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). 2018. Guideline on user safety of topically administered veterinary medicinal products (EMA/CVMP/SWP/721059/2014)
- Elias, D.J., Thompson, R.D., Savarie, P.J. 1978. Effects of the anticoagulant diphenadione on suckling calves. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 71-78.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2006. Evaluation of certain veterinary

- drug residues in food; 66th report of the joint FAO/WHO Expert committee, WHO Technical Report series, n°939.
- Field, J.B., 1945. Hypoprothrombinemia induced in suckling rats by feeding 3,3'-methylenebis(4-hydroxycoumarin) and acetylsalicylic acid to their mother. *Am. J. Physiol.* 143, 238-242.
- Foley, S.R., Solano, C., Simonova, G., Spanevello, M.M., Bird, R.J., Semple, J.W., Jackson, D.E., Schibler, A., Fraser, J.F., Fung, Y.L. 2014 A comprehensive study of ovine haemostasis to assess suitability to model human coagulation. *Thrombosis Research*, 134, 468-473.
- Fries, K., König, F.E., Reich, T. 1957. Einfluss der Marcoumar-Therapie bei voll gestillten Kindern. *Schweizerische medizinische Wochenschrift.* 87, 615-617.
- Fourel, I., Damin-Pernik, M., Benoit, E., Lattard, V., 2017. Core-shell LC-MS/MS method for quantification of second-generation ARs diastereoisomers in rat liver in relationship with exposure of wild rats. *J. Chrom. B.* 1041, 120-132.
- Helsel, D.R., 2005. *Nondetects and Data Analysis Statistics for Censored Environmental Data.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. NJ, USA.
- Ibrahim, S.A., Tse, T., 2018. Impact of rodenticides on the coagulation properties of milk. *Foods* 7, 57-66.
- Jacob, J., Buckle, A. 2018. Use of anticoagulant rodenticides in different applications around the world. In van den Brink N, Elliott JE, Shore RF, Rattner BA, eds, *Anticoagulant rodenticides and wildlife.* Springer Nature, Cham, Switzerland, pp 11-44.
- Lefebvre, S., Fourel, I., Queffelec, S., Vodovar, D., Megarbane, B., Benoit, E., Siguret, V., Lattard, V., 2017. Poisoning by ARs in humans and animals: causes and consequences. In *Poisoning: from specific toxic agents to novel rapid and simplified techniques for analysis.* Chapter 2.

- Lefebvre, S., Hascoet, C., Damin-Pernik, M., Rannou, B., Benoit, E., Lattard, V., 2017. Monitoring of antivitamin K-dependent anticoagulation in rodents – Towards an evolution of the methodology to detect resistance in rodents. *Pestic. Biochem. Physiol.* 138, 29-36.
- Leite Carlos M., Melo M., Soto-Blanco B. 2017. Influence of sex on activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT) in sheep. *Vet Ital.* 53(3):255-258
- Li, T., Chang, C.-Y., Jin, D.-Y., Lin, P.-J., Khvorova, A., Stafford, D.W., 2004. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427, 541-544.
- Martin, G.R., Sutherland, R.J., Robertson, I.D., Kirkpatrick, W.E., King, D.R., Hood, P.J. 1991. Assessment of the potential toxicity of a poison for rabbits, pindone (2-pivalyl 1,3 indandione), to domestic animals. *Australian Vet. J.* 68, 241-243.
- Murphy, M.J. 2002. Rodenticides. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 32, 469-484.
- O'Reilly, R.A., Aggeler, P.M., 1970. Determinants of the response to oral anticoagulant drugs in man. *Pharmacol. Review.* 22, 35-96.
- Pitt, W.C., Higashi, M., Primus, T.M., 2011. The effect of cooking on diphacinone residues related to human consumption of feral pig tissues. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2030-2034.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hortnagel, K., Pelz, H.-J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G.D., Muller, C.R., Strom, T.M., Oldenburg, J. 2004. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427, 537–541.
- Sheafor, S.E., Couto, C.G. 1999. Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 38-46.
- Siller-Matula J.M., Plasenzotti R., Spiel A., Quehenberger P., Jilma B. 2008. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost.* 100(3):397-404.
- Standing Committee on Biocidal Products. 2009. Chlorophacinone – product-type 14

(Rodenticides) – Assessment report. <https://circabc.europa.eu/sd/a/74b7f903-710d-4ec8-bec5-6131318fb992/Draft%20assessment%20report%20Chlorophacinone.pdf>

Thompson, R.D., Mitchell, G.C., Burns, R.J., 1972. Vampire bat control by systemic treatment of livestock with an anticoagulant. *Science*. 177, 806-808.

Waddell, L.S., Poppenga, R.H., Drobatz, K.J. 2013. Anticoagulant rodenticide screening in dogs: 123 cases (1996-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242, 516-521.

Woody, B.J., Murphy, M.J., Ray A.C., Green, R.A. 1992. Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 6, 23-28.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Distribution of chlorophacinone concentrations in plasma and prothrombin time on Days 3 and 11. A/ Box plot and distribution of chlorophacinone in plasma on Day 3. B/ Box plot and distribution of prothrombin time on Day 3. C/ Box plot and comparison of chlorophacinone on Days 3 and 11, and distribution of chlorophacinone in plasma on Day 11. D/ Box plot and comparison of prothrombin time on Days 3 and 11, and distribution of prothrombin time on Day 11.

Figure 2. Distribution and box plot of chlorophacinone concentrations in milk on Day 3 (n=23 animals).

Figure 3. Changes in chlorophacinone concentrations in milk over time (mean $K_{el} = 0.01489$; $R^2=0.9676$, n=10 animals).

Figure 4- Relation between chlorophacinone residues in milk and plasma. Dotted lines represent the 95% confidence intervals for the linear regression model. Statistical analysis was done to test the hypothesis of a slope significantly non zero.

Figure 5- Prothrombin time versus chlorophacinone concentration in plasma (A) and milk (B).

Table 1: Prothrombin time and plasma chlorophacinone concentration of accidentally exposure flock ewes on day 3

Plasma chlorophacinone	N	Prothrombin time (mean \pm SD in sec)
LOQ	5	27.45 \pm 4.46 ^a
>LOQ to 50 ng/mL	7	23.68 \pm 1.92 ^a
>50 to 500 ng/mL	8	28.02 \pm 10.67 ^b
>500 ng/mL	3	50.83 \pm 7.47 ^d

Means with different letter superscripts are different by Tukey's HSD test ($p < 0.025$).

Table 2. Concentration of chlorophacinone in milk (>LOQ) of ewes between days 2 and 7 post-accidental exposure for animals with detectable chlorophacinone and for the entire flock.

Day post-exposure	2	3	4	5	6	7
Animals with detectable chlorophacinone in milk^a						
Number of animals	13	12	12	12	12	12
[chlorophacinone] in milk (ng/ml)	3.84 [0.40-11.50]	3.37 [0.69-8.89]	2.57 [0.39-6.91]	1.53 [0.36-3.52]	1.08 [0.28-2.41]	0.37 [0.13-0.90]
Entire flock (n=23)^b						
[chlorophacinone] in milk (ng/ml)	2.17-2.22 [LOQ-11.50]	1.76-1.80 [LOQ-8.89]	1.45-1.50 [LOQ-6.91]	0.80-0.85 [LOQ-3.52]	0.57-0.61 [LOQ-2.41]	0.190.24 [LOQ-0.90]

^aValues are mean and [range of values] for animals with detectable chlorophacinone in milk.

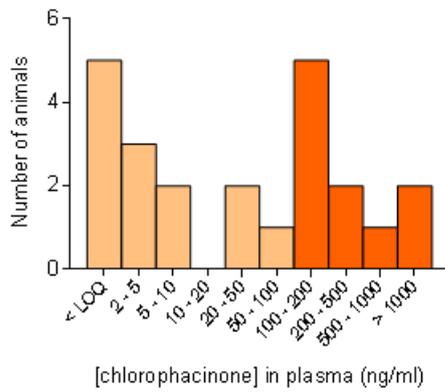
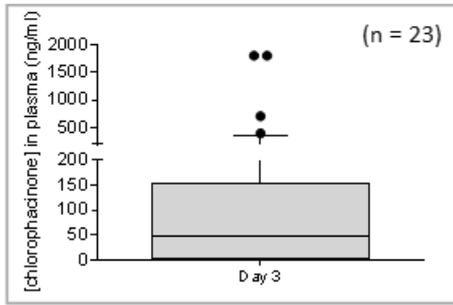
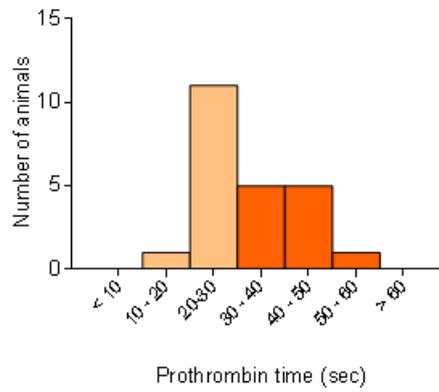
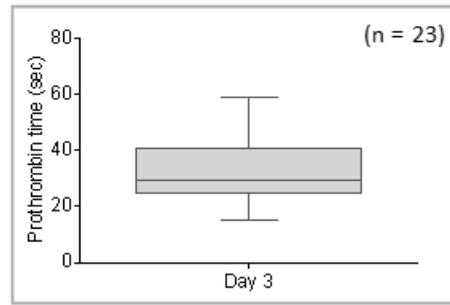
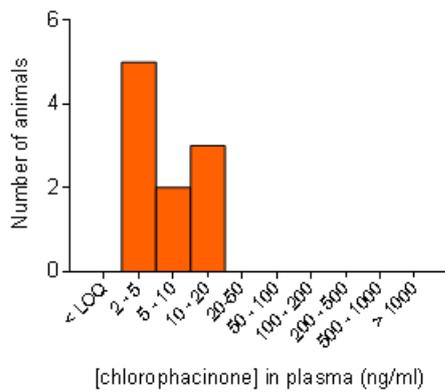
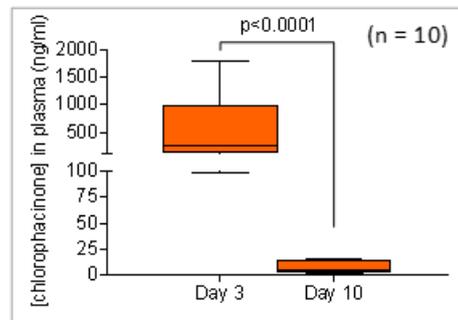
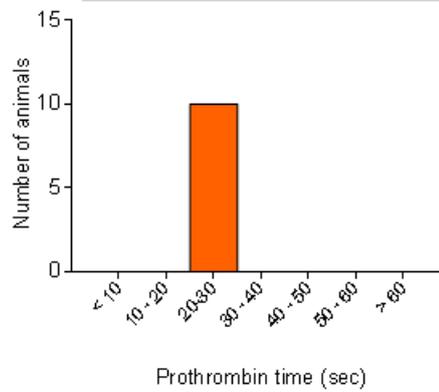
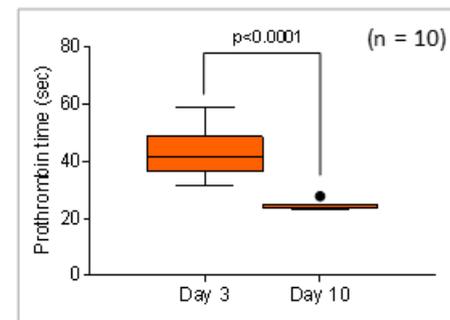
^bValues are Kaplan-Meier mean and [range of values] for the entire flock.

Table 3. Pharmacokinetics parameters of chlorophacinone in milk of ewes

	K_{el} (h⁻¹)	T_{1/2} (h)	C₀ (ng/ml)	R²
	[95% CI]	[95% CI]	[95% CI]	
Animal 1	0.01277 [0.007909 – 0.01762]	54.26 [39.33 - 87.62]	4.68 [2.89 – 6.48]	0.951
Animal 2	0.01461 [0.009647 – 0.01957]	47.33 [35.41 – 71.83]	2.03 [1.27 – 2.78]	0.9591
Animal 3	0.01179 [0.003483 – 0.02011]	58.77 [34.46 – 198.9]	1.60 [0.57 – 2.63]	0.8891
Animal 4	0.01729 [0.01272 – 0.02186]	40.08 [31.70 – 54.48]	4.32 [2.93 – 5.71]	0.978
Animal 5	0.01424 [0.009652 – 0.01882]	48.66 [36.82 – 71.79]	14.58 [9.51 – 19.64]	0.9653
Animal 6	0.01706 [0.01255 – 0.02157]	40.62 [32.13 – 55.22]	14.26 [9.71 – 18.81]	0.9789
Animal 7	0.01557 [0.01222 – 0.01892]	44.50 [36.63 – 56.71]	3.53 [2.66 – 4.39]	0.9848
Animal 8	0.01913 [0.01324 – 0.02502]	36.22 [27.69 – 52.34]	30.12 [18.13 – 42.11]	0.9737

Animal 9	0.01258 [0.004087 – 0.02106]	55.08 [32.90 – 169.56]	6.44 [2.11 – 10.77]	0.8527
Animal 10	0.01386 [0.007176 – 0.02055]	50.00 [33.72 – 96.5]	20.70 [10.11 – 31.29]	0.9284
All animals	0.01489 [0.01321 – 0.01657]	47.55 [42.35 – 52.76]	/	

Results are means with 95% confidence interval. K_{el} : calculated elimination constant; $T_{1/2}$: calculated elimination half-life; C_o : extrapolated initial concentration in milk

A/**B/****C/****D/****Figure 1**

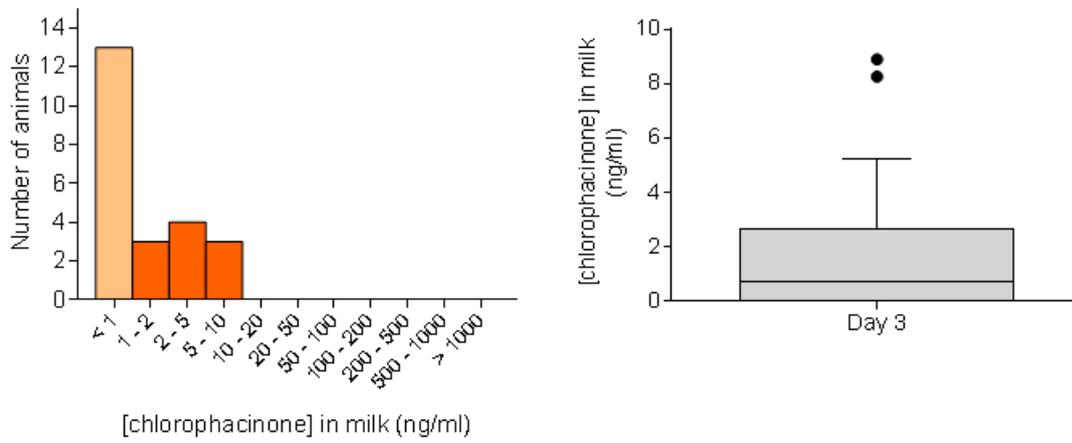


Figure 2

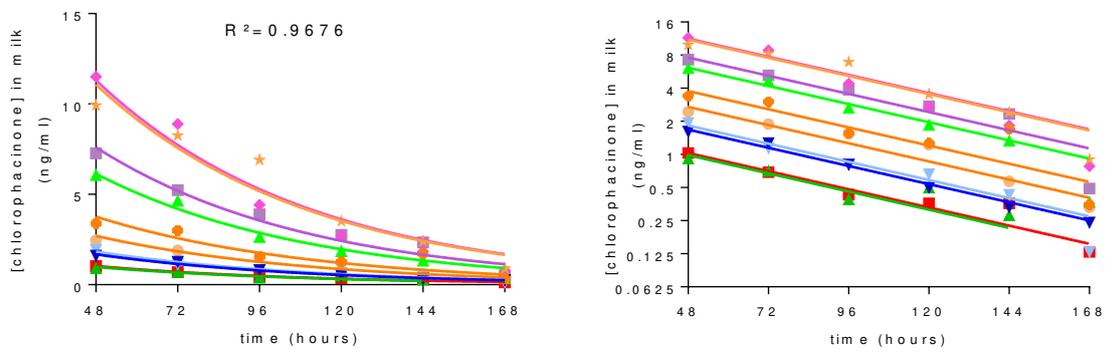


Figure 3

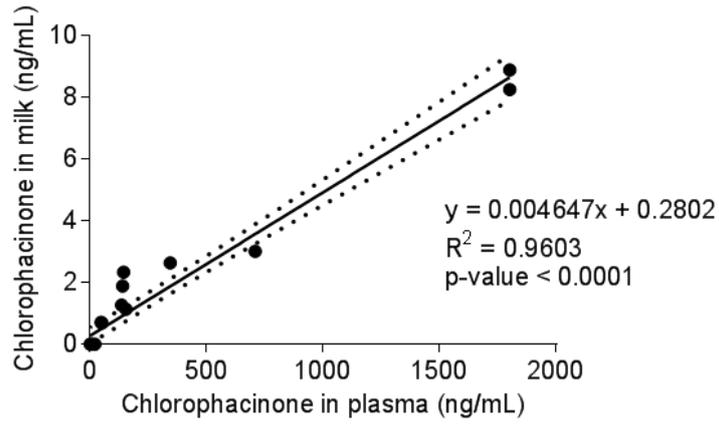


Figure 4

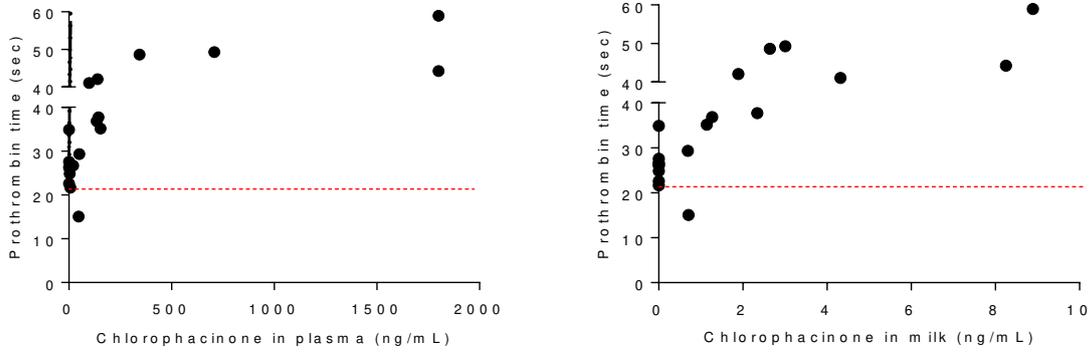


Figure 5

IV.2. Ecotoxicité des AVK et impacts sur la faune sauvage non-cible : étude de l'exposition secondaire de rapaces collectés en France

Ce travail correspond à l'article 3 de la thèse, intitulé en anglais : « Exposure of predatory and scavenging birds to anticoagulant rodenticides in France: exploration of data from French surveillance programs ».

IV.2.1. Objectifs

L'objectif principale de cette étude est de caractériser l'exposition secondaire aux AVK de rapaces collectés dans le sud-est de la France, en estimant la prévalence de cette exposition, chez les rapaces prédateurs mais également chez les charognards, avec une réflexion sur les voies d'exposition de ces individus. Forte de données collectées sur 12 ans, l'étude vise également à évaluer l'impact des politiques publiques françaises et européennes dans la mitigation du risque d'exposition aux AVK de la faune sauvage non-cible. Enfin, l'étude tend à illustrer la complexité du diagnostic post-mortem de la toxicité des AVK, en s'intéressant à plusieurs marqueurs : tableau clinique (présence d'hémorragies) et concentrations en AVK dans le foie.

IV.2.2. Méthodes

Les méthodes mises en place dans cette étude correspondent à deux aspects principaux :

- L'analyse de la base de données d'autopsies de rapaces du CNITV : cette base est alimentée par le Dr Florence Buronfosse, membre bénévole du CNITV, ainsi que par les autres vétérinaires travaillant pour le centre (dont l'auteur de ce travail de recherche). Elle regroupe les rapports d'autopsie détaillés de tous les rapaces ayant été intégrés à la veille toxicologique réalisée par le CNITV, dans le cadre de partenariats avec des programmes de réintroduction pilotés par des associations naturalistes comme la Ligue de Protection des Oiseaux (LPO), sur une zone géographique correspondant grossièrement au quart sud-est de la France. La présente étude s'intéresse aux données collectées entre 2008 et 2019, qui ont été codifiées et analysées (n = 245 individus).
- La collecte systématique d'échantillons de foie chez les rapaces autopsiés, quand l'état du cadavre le permettait (n = 156) : ces échantillons ont été stockés à -80°C, et analysés selon la

même technique entre 2016 et 2020, i.e. par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS – LOQ = 2 ng/g MF). Cette technique développée au sein de l'unité de recherche USC1233 a été décrite dans la littérature (Fourel et al., 2017). Les AVK recherchés correspondaient à 3 AVK de première génération (warfarine, chlorophacinone et coumatétralyl) et 5 AVK de seconde génération (bromadiolone, brodifacoum, difenacoum, flocoumafène et diféthialone). Les concentrations retrouvées ont été exprimées en ng/g MF, et converties par la suite en pmol/g MF, en se basant sur les masses molaires de chaque AVK, afin de tenter de prendre en compte les différences de puissance entre chaque molécule dans la quantification des résidus hépatiques.

IV.2.3. Principaux résultats

IV.2.3.1. Population d'étude, causes de la mort

Au total, 245 oiseaux ont été autopsiés, dont une majorité de vautours fauves *Gyps fulvus* (n = 139, 56,7%), des oiseaux charognards qui représentent la population de rapaces majoritaire dans la zone de collecte. Les principales causes de mortalité des rapaces autopsiés étaient le trauma (29%) et l'électrocution (20,4%), deux facteurs de mortalité bien connus pour les rapaces.

IV.2.3.2. Exposition aux AVK

Des résidus d'AVK ont été quantifiés dans la moitié des échantillons de foie analysés (78/156), avec une prévalence significativement plus élevée dans la sous-population de rapaces prédateurs (33/40, 82,5%), pour qui les voies d'exposition sont relativement bien connues, que dans celle des charognards (45/116, 38,8%). Cette prévalence chez les rapaces charognards demeure tout de même conséquente, et les voies de contamination de ces individus sont moins évidentes, car les rongeurs cibles et non-cibles contaminés n'appartiennent pas à leur régime alimentaire.

Des AVK de seconde génération ont été détectés dans une grande majorité des échantillons positifs (76/78, 97,4%), tandis que pour les AVK de première génération, seule la chlorophacinone a été détectée de manière très marginale dans seulement 7,7% des échantillons positifs (6/78). Ces observations coïncident avec la rémanence plus importante des AVK de seconde génération décrite dans la littérature. Cependant, il est à noter que les concentrations détectées étaient généralement relativement modérées, avec seulement 21 échantillons présentant une concentration totale en AVK de seconde génération supérieure à 100 ng/g de poids frais. En convertissant ce seuil en masse

molaire (avec le brodifacoum utilisé comme référence : 100 ng/g MF de brodifacoum correspondent à 191 pmol/g MF), ces mêmes 21 échantillons le dépassaient. La majorité des échantillons positifs présentaient une contamination à deux AVK différents ou plus (50/78, 64,1%), suggérant une exposition multiple à ces substances, plutôt sur un mode chronique.

IV.2.3.3. Effet des politiques publiques sur la mitigation du risque d'exposition aux AVK

Pour évaluer l'impact des différentes réglementations sur l'exposition des rapaces non-cibles, les échantillons ont été classés selon 3 périodes :

- 2008-2010 (n = 17) ;
- 2011-2013 (n = 24), suite à l'arrêt d'utilisation de la chlorophacinone comme PPP ;
- 2014-2019 (n = 115), correspondant à la période suivant l'obligation d'utilisation des stations d'appâtage par les professionnels pour les AVK biocides.

Une baisse significative a été montrée dans la proportion d'individus exposés à la chlorophacinone entre les périodes 2008-2010 et 2014-2019 (test de Fisher apparié, $p = 0,0213$) : cependant cette baisse est à relativiser par le nombre faible de détections de la chlorophacinone dans les échantillons analysés (n = 6 au total) ainsi que par la persistance moindre de la chlorophacinone dans les tissus.

A l'inverse, une tendance significative à l'augmentation a été observée entre les périodes pour la détection du brodifacoum (test de Fisher, $p = 0,0398$), malgré la réglementation sur les stations d'appâtage. Même si elle n'est pas significative, on peut également observer une augmentation de la fréquence de détection des autres AVK de seconde génération entre les périodes (Figure 16). Cela suggère que des mesures supplémentaires devraient être mises en place pour mieux gérer le risque d'exposition de la faune non-cible, mais également que l'utilisation des AVK en tant que biocides (par opposition aux usages PPP autorisés uniquement pour la chlorophacinone jusqu'en 2010 et la bromadiolone jusqu'en 2020) contribue fortement à l'exposition des rapaces non-cibles. On peut également envisager un usage illégal des AVK de seconde génération en tant que traitement phytosanitaire, qui contribuerait à leur exposition.

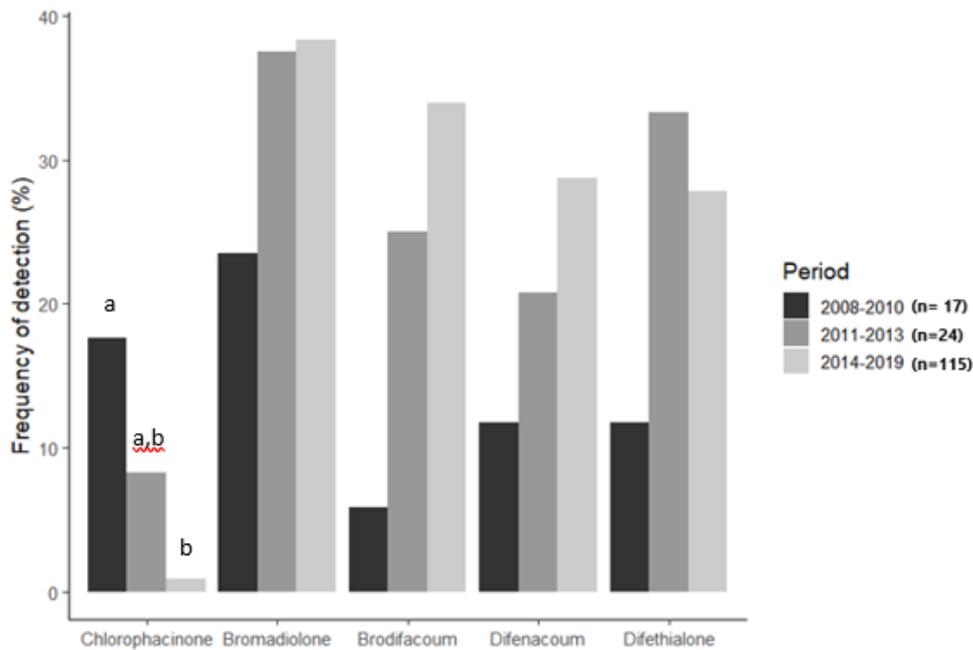


Figure 16 : Fréquence de détection de chaque AVK pour chaque période.
 (Les lettres différentes illustrent une différence significative entre les périodes.)

IV.2.3.4. Diagnostic d'intoxication aux AVK

Seuls 130 oiseaux sur les 156 analysés ont été examinés concernant la présence ou non d'hémorragies, l'état de décomposition des autres individus ne permettant pas de conclure. Des hémorragies ont été observées chez 88 oiseaux, mais initialement aucun n'a été diagnostiqué comme étant intoxiqué aux AVK : pour la plupart (71/88), une cause de la mort compatible avec la présence d'hémorragies (trauma, électrocution, processus infectieux) a été déterminée. Cependant, pour 9 de ces individus, la cause de la mort n'a pas pu être déterminée, et parmi ceux-ci, 6 présentaient des résidus d'AVK dans le foie, dont 4 Milans royaux (*Milvus milvus*) présentant des niveaux assez conséquents, entre 27,3 et 191,9 ng/g. Le Tableau 6 présente les concentrations retrouvées chez ces 4 individus ainsi que la description des lésions hémorragiques observées : si les lésions retrouvées chez les individus 1 et 2 ne sont pas forcément en faveur d'une coagulopathie, celles rapportées chez les individus 3 et 4, combinées à des concentrations en AVK de seconde génération élevées, suggèrent une intoxication aux AVK chez ces oiseaux. Le taux d'oiseaux testés et intoxiqués par les AVK serait donc de 1,3% (2/156), ce qui est relativement faible.

Aucune différence n'a pu être établie au niveau des concentrations hépatiques en AVK de seconde génération pour les individus présentant ou non des hémorragies (test de Wilcoxon, $p = 0,3814$), même en excluant le trauma et l'électrocution comme sources possibles de biais ($p = 0,2584$), ou en

ne retenant que les individus dont la cause de la mort était inconnue ($p = 1$). Aucune différence significative n'a pu être démontrée non plus en classant les individus par rapport au seuil de concentration couramment rapporté dans la littérature de 100 ng/g MF, et en comparant la fréquence des hémorragies entre les individus présentant des concentrations hépatiques au-dessus et au-dessous du seuil (test de Chi-2, $p = 0,8117$).

Ces résultats illustrent la complexité du diagnostic *post-mortem* des intoxications aux AVK, et contribuent à la remise en question de la pertinence d'un seuil de concentration en AVK comme marqueur de la toxicité de ces molécules.

Tableau 6: Niveaux d'AVK et lésions hémorragiques chez les individus suspectés d'intoxication aux AVK

Oiseau	Espèce	Année	CHLORO	BROMA	BFC	DFC	DFT	ΣAVK seconde génération	Lésions hémorragiques macroscopiques à l'autopsie	Caillot sanguin dans la cavité cardiaque (O/N)
			(ng/g MF)							
1	Milan royal	2013	0	31,6	2,1	0	0	33,7	Hématome sous-cutané dans la région thoracique Effusion péricardique séro-hémorragique	O
2	Milan royal	2018	0	2,1	25,2	0	0	27,3	Hémorragie de l'oeil droit Léger saignement à la surface pulmonaire	O
3	Milan royal	2018	0	52,5	8	63,2	68,2	191,9	Hématome du muscle pectoral droit et du cou Présence de sang dans la cavité abdominale Hémorragie pulmonaire Hémorragie du tractus digestif Plusieurs hématomes à la surface de la boîte crânienne	N
4	Milan royal	2019	0	4,4	86	0	5,8	96,2	Hématome sous-cutané dans la région thoracique Hémorragie pulmonaire Hémorragie péricardique	N

Abréviations : CHLORO, chlorophacinone ; BROMA, bromadiolone; BFC, brodifacoum ; DFC, difenacoum ; DFT, diféthialone.

Article 3 :

Exposure of predatory and scavenging birds to anticoagulant rodenticides in France: exploration of data from French surveillance programs

Meg-Anne Moriceau (1,2), Sébastien Lefebvre (1), Isabelle Fourel (1), Etienne Benoit (1), Florence Buronfosse (2), Pascal Orabi (3), Barnett A. Rattner (4), Virginie Lattard (1)*

1.USC1233 RS2GP, INRA, VetAgro Sup, Univ Lyon, F69 280 Marcy-l'Étoile, FR

2.CNITV, VetAgro Sup, 1 avenue Bourgelat, 69 280 Marcy-l'Étoile, FR

3.French Bird Protection League (LPO France)

4.U.S. Geological Survey, Eastern Ecological Science Center, Beltsville, MD 20705,

USA

*Corresponding author: Virginie Lattard

USC1233 INRA-Vetagro Sup 69280 Marcy l'Etoile, France

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

ABSTRACT

Wild raptors are widely used to assess exposure to different environmental contaminants, including anticoagulant rodenticides (ARs). ARs are used on a global scale for rodent control, and act by disruption of the vitamin K cycle that results in haemorrhage usually accompanied by death within days. Some ARs are highly persistent and bioaccumulative, which can cause significant exposure of non-target species. We characterized AR exposure in a heterogeneous sample of dead raptors collected over 12 years (2008-2019) in south-eastern France. Residue analysis of 156 liver samples through LC-MS/MS revealed that 50% (78/156) were positive for ARs, with 13.5% (21/156) having summed second-generation AR (SGAR) concentrations >100 ng/g ww. While SGARs were commonly detected (97.4% of positive samples), first-generation ARs were rarely found (7.7% of positive samples). ARs were more frequently detected and at greater concentration in predators (prevalence: 82.5%) than in scavengers (38.8%). Exposure to multiple ARs was common (64.1% of positive samples). While chlorophacinone exposure decreased over time, an increasing exposure trend was observed for the SGAR brodifacoum, suggesting that public policies may not be efficient at mitigating risk of exposure for non-target species. Haemorrhage was observed in 88 birds, but AR toxicosis was suspected in only 2 of these individuals, and no difference in frequency of haemorrhage was apparent in birds displaying summed SGAR levels above or below 100 ng/g ww. As for other contaminants, 17.2% of liver samples (11/64) exhibited Pb levels compatible with sub-clinical poisoning (>6 µg/g dw), with 6.3% (4/64) above the threshold for severe/lethal poisoning (>30 µg/g dw). Nine individuals with Pb levels >6 µg/g dw also had AR residues, demonstrating exposure to multiple contaminants. Broad toxicological screening for other contaminants was positive for 18 of 126 individuals, with carbofuran and mevinphos exposure being the suspected cause of death of 17 birds. Our findings demonstrate lower but still substantial AR exposure of scavenging birds compared to predatory birds, and also illustrate the complexity of diagnosing AR toxicosis through forensic investigations.

Keywords: *raptors, biomonitoring, exposure, anticoagulant rodenticide*

1. INTRODUCTION

Wild raptors are widely used in Europe for biomonitoring trends in environmental contamination, natural resource management and as sentinels for human health, although harmonization of pan-European monitoring programs has yet to be achieved (Badry et al., 2020; Espín et al., 2016; Gómez-Ramírez et al., 2014). In free-ranging raptors, many studies have assessed exposure to various environmental contaminants, including lead (Pb) (Descalzo et al., 2021; Finkelstein et al., 2012; Krone, 2018; Mateo, 2009; Monclús et al. 2020), veterinary drugs (e.g. diclofenac) (Bean and Rattner,

2018; Cuthbert et al., 2011, 2014; Gómez-Ramírez et al. 2020; Swan et al., 2006), pesticides (e.g., organophosphorus and carbamates) (Allen et al., 1996; Botha et al., 2015), and anticoagulant rodenticides (ARs) (Albert et al., 2010; Murray, 2011, 2017, 2020; Rattner and Harvey, 2021; Thomas et al., 2011). Anticoagulant rodenticides have been widely used since the 1950's for pest control (Wardrop and Keeling, 2008). Widespread resistance of rodents to some first generation ARs (FGARs; e.g., warfarin) became apparent in the 1950's, which eventually resulted in the development of second-generation compounds (e.g., bromadiolone, brodifacoum, difenacoum, difethialone and flocoumafen; Buckle et al., 1994; Goulois et al., 2017; Lefebvre et al., 2016; Marquez et al., 2019). ARs disrupt the vitamin K cycle by inhibiting vitamin K epoxide reductase (VKOR), leading to impaired blood coagulation that can be fatal to both target pest species and non-target species (reviewed in Rached et al., 2020).

Second-generation ARs (SGARs) are persistent, bioaccumulative and toxic compounds, and are currently the most commonly used products to control rodent populations. Non-target exposure to ARs may be primary (e.g., direct consumption of baits) or secondary (e.g., consumption of intoxicated or dead rodents that had been exposed to ARs), and can include transfer through food webs (Hindmarch and Elliott, 2018). Multiple AR residues reflect repeated exposure that could lead to adverse effects (Rattner and Harvey, 2021) and also reflect the complexity of exposure pathways (Hindmarch and Elliott 2018; Rattner et al. 2014). Contamination of non-target raptors with SGARs is globally widespread (Albert et al., 2010; Murray, 2011, 2017, 2020; Rattner and Harvey, 2021; Thomas et al., 2011; Van den Brink et al., 2018). Prevalence of ARs exposure in wild predatory birds and mammals was recently estimated as 58%, reviewing data from North America (Canada, USA), Europe (UK, Denmark, France and Spain) and New Zealand between 1984 and 2015 (López-Perea and Mateo, 2018). Data are more scarce for scavenging birds.

In France, ARs are authorized as biocides to be used by professionals and the public in urban and suburban settings (European Biocidal Product Regulation N°528/2012) and are also used as plant protection products (PPP, e.g. for the control of the European water vole *Arvicola amphibius* in crops and meadows up to 2020) (Giraudoux et al., 2012). Chlorophacinone was used as a PPP in France till the end of 2010 (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2007), and bromadiolone was authorized for this use till its recent withdrawal (21 February 2020 - see https://www.anses.fr/fr/system/files/phyto/decisions/SUPERCAIDA_PREX_2015-1399_D.pdf) by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety. Other ARs are only authorized as biocides. Regulatory measures were also implemented in an attempt to reduce SGAR exposure of non-target fauna through biocidal use. Starting in 2013 within the European Union, rodenticide baits to be placed indoors or in and around buildings must be in tamper-resistant bait

stations. These stations limit primary exposure of non-target species by physically preventing access to baits (Berny et al., 2014; Nakagawa et al., 2015; Suárez and Cueto, 2018), but regrettably still may permit bait access of non-target species of a similar size as pest rodents. To our knowledge, the success of these public policies has not been thoroughly assessed.

Diagnosis of AR lethal intoxication is complex, generally associating post-mortem lesions suggestive of AR poisoning (i.e., hemorrhages) and quantifiable residues in the liver (Murray, 2018). However, there is no consensus on the toxicity threshold to distinguish between sublethal exposure and poisoning (Rattner and Harvey, 2021). An often cited toxicity threshold for SGAR levels of >100 to 200 ng/g liver wet weight (ww) has been suggested to be potentially lethal (Newton et al., 1999), although both field observations and modeling efforts indicate that SGAR toxicity and lethality can occur at much lower levels (Thomas et al., 2011), and species-specific differences in sensitivity are notable (Rattner and Harvey, 2021). It was also recently suggested that due to large differences in molecular weight and VKOR inhibitory potency, summing of ARs should be limited to second-generation ARs, and it may be appropriate to present exposure data on both a summed mass basis and summed molar basis (Rattner et al., 2020; Rattner and Harvey, 2021).

Herein we present findings characterizing prevalence and factors affecting AR exposure in raptors sampled in France, through analysis of residues in liver of dead predatory and scavenging birds collected over a 12-year period by several bird of prey surveillance programs. The effects of public policies to mitigate risk to non-target fauna were also assessed. We examined diagnosis of AR intoxication using both hepatic AR concentration and molar values that may better represent exposure. As these avian samples were part of broad biomonitoring programs, results of other toxicological analyses (lead, some pesticides and pharmaceuticals) are briefly mentioned to emphasize concomitant exposure to multiple contaminants in wild birds.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Collection of postmortem data: use of a French surveillance database

Raptors (in most instances carcasses) were collected over a 12 year period (2008-2019) from several bird of prey surveillance programs [e.g., LIFE GYPCONNECT that include partnerships with associations such as the Bird Protection League (LPO), and the National Centre for Veterinary Toxicological Information (CNITV); Supplemental Table S1]. Sampling was principally focused on mountainous areas of southeastern France, from the eastern Pyrenees to Alps, in the regions of Auvergne-Rhône-Alpes, Occitanie and Provence-Alpes-Côte d'Azur, especially in the regional natural parks of Baronnies, Grands Causses, Vercors and Verdon, and southern department of Aude, which are the working areas for LIFE GYPCONNECT (see Figure 1 for the summary of origins of all

individuals). Scavenging birds accounted for the majority of samples (see Table 1 for the number of individuals per species collected).

Carcass collections were performed by field agents, usually on the day of the animal death or within a few days thereafter. Carcasses were frozen (-18°C), and subsequently thawed and necropsied within a variable time frame (several days to a month) by veterinarians of CNITV. While those veterinarians were not pathologists, necropsies were supervised by a senior veterinarian with over 20 years of experience in bird of prey necropsy. For each specimen, history of the carcass (collection location, date of discovery, description of the area) was provided, and information on the species, sex, as well as descriptions of the external aspects and of all organs were compiled during necropsies. Radiographs were performed, and gastric content, liver, kidney, muscle and bone were sampled. Only liver samples were used for this study.

Findings were coded in a database, with details on lesions, results of toxicological analysis and possible cause of death. All necropsy reports in the database were analysed to identify elements for further exploration. Parameters which were not systematically documented (e.g. age of birds and state of decomposition) were not coded for further analysis. Presence/absence of haemorrhages was coded based on keywords in the report (“haemorrhage”, “bleeding”, “anaemia”, “bruising”, “haematoma”, “blood”), and reports with at least one of these keywords were read to determine whether or not the animal had displayed haemorrhages. Conclusions of reports were analysed, with cause of death classified in six categories [e.g., Electrocutation, Trauma, Intoxication, Other (external cause; suspected drowning, poisoning), Other (internal cause; suspicion of a tumoral process, cardiopathy, infectious disease, etc.), and Unknown].

2.2. Sample analysis

AR residue analysis of liver samples was conducted using a previously described liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method (Fourel et al., 2017a). Analytes quantified included 3 first-generation ARs (i.e., warfarin, coumatetralyl, chlorophacinone) and 5 second-generation ARs (SGARs) used in Europe (i.e., bromadiolone, brodifacoum, difenacoum, flocoumafen and difethialone). Limit of quantification (LOQ) was 2 ng/g ww. All analyses (samples collected between 2008 and 2019, stored at -80°C) were performed between 2016 and 2020 using the same analytical procedures.

As collected birds were part of broad toxicological surveillance programs, it should be noted that some of the samples were also sent to other external laboratories for lead (Pb) analysis (French departmental laboratory of Drôme, LDA 26) by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and for a broad toxicological screening with a panel of more than 500 environmental

contaminants (mostly pesticides and pharmaceuticals, laboratory Ecologie-La Voulte) using LC-MS/MS. Results from those other analyses will only be briefly mentioned in this paper.

2.3. Statistical analyses

Descriptive statistics and graphs were generated with R software (version 3.5.1) associated with RStudio (version 1.1.453). Concentrations of ARs in liver were expressed as ng/g ww, and also converted to pmol/g ww (or equivalent nmol/kg ww) using the molecular weight for each AR (PubChem: chlorophacinone = 374.8 g/mol bromadiolone = 527.4 g/mol, brodifacoum = 523.4 g/mol, difenacoum = 444.5 g/mol, difethialone = 539.5 g/mol). As warfarin, coumatetralyl and flocoumafen concentrations were consistently below the LOQ, those ARs were excluded from statistical analyses.

For descriptive results of the levels of ARs (analytes with <50% of samples below the LOQ), the Kaplan-Meier method was used to estimate the extremes of the mean (Helsel, 2005). Lower bound was calculated replacing values below the LOQ by 0.02 ng/g ww, while upper bound was obtained by replacing those values by the LOQ (i.e., 2 ng/g ww). For each species, the range of values, number of animals above LOQ and number of animals with a sum of SGARs above the literature threshold of 100 ng/g ww (Newton et al., 1999) were described.

To assess AR exposure by feeding regimen, a simple classification was implemented. All vultures were categorized as scavengers, while other raptors, including facultative scavengers (e.g., Golden eagle, *Aquila chrysaetos*), were classified as predators. Chi-squared test was used to detect differences in AR exposure between scavengers and predators for prevalence data (e.g., AR detection rate) and t-test for continuously distributed variables (e.g. summed SGARs concentration). Other factors, such as presence of multiple ARs, species (retaining only species with sample sizes ≥ 5 individuals), gender and area of discovery (department), were also tested. Parametric tests (t-test) were used for sample size > 30 individuals, while non-parametric procedures (Wilcoxon or Kruskal-Wallis, depending on the number of categories) were used for smaller sample size comparison of AR concentration.

To evaluate the effect of change in public policies in France related to AR usage on detection frequency, samples were grouped into 3 different key temporal periods: 2008-2010 (end of chlorophacinone use as a plant protective product in 2010), 2011-2013 (new regulations on SGARs in 2013, brodifacoum, difenacoum and difethialone only to be used in bait boxes starting from 2013) and 2014-2019. Differences in exposure among those 3 key periods were assessed for each AR using Fisher's exact test.

The relation between levels of SGARs found in the liver samples and evidence of AR intoxication (i.e., presence/absence of haemorrhage, for each individual) was examined using non-parametric

Wilcoxon test. As trauma and electrocution were considered as possible biases for the presence of haemorrhages, individuals with such mortality classifications were removed for additional analysis. To test the commonly reported threshold of 100 ng/g ww, birds positive for SGARs were then classified into 2 groups, namely those with summed hepatic SGARs <100 ng/g ww or \geq 100 ng /g ww, and compared using Chi-squared test (all individuals) or Fisher's Exact test (birds with "Unknown" cause of death), based on the presence/absence of haemorrhages. As trauma is a common cause for haemorrhage, relationship between AR exposure and presence of haemorrhage in birds that died from trauma was also tested through Fisher's Exact test.

For liver lead (Pb) concentrations, toxicity thresholds reported in literature were used to classify the results [subclinical poisoning (2 to <6 μ g/g ww, corresponding to 6 to <18 μ g/g dry weight), clinical poisoning (6-10 μ g/g ww, i.e., 18-30 μ g/g dw), and severe poisoning compatible with death (>10 μ g/g ww or >30 μ g/g dw)] (Descalzo et al., 2021; Pain et al., 2019).

3. RESULTS

3.1. Study population, causes of death

In total, 245 birds were necropsied, with the most represented species being Griffon vulture (*Gyps fulvus*; n=139, 56.7% of samples), Red kite (*Milvus milvus*; n=32, 13.1%), Cinereous vulture (*Aegypius monachus*; n=26, 10.6%) and Bearded vultures (*Gypaetus barbatus*; n=14, 5.7%). Scavengers accounted for the majority of collected samples (73.1%). Excluding cases for which the cause of death could not be determined (i.e., unknown, n=62, 25.3%), the principal causes of mortality were trauma and electrocution (n=71, 29% and n=50, 20.4%, respectively). Two birds (one with trauma, one electrocuted) were found alive but were euthanised due to poor prognosis for survival. Other reported causes were internal disorders (mainly infectious processes, 13.1%), intoxication (lead or other contaminants, i.e., carbofuran, mevinphos or pentobarbital, 9.4%) and other external causes (drowning, envenomation, 2.9%).

3.2 AR exposure

Liver samples were not available for all specimens recorded in the database (absent due to consumption of part of the carcass before collection or advanced decomposition), and thus only 156 samples were analysed for ARs (63.7% of individuals).

3.2.1 Prevalence and concentrations of ARs

Of the 156 liver samples analysed, 78 (50.0%) were found positive for at least one AR at a concentration exceeding the LOQ (Table 1). While the FGAR chlorophacinone was present in only 6 birds (4% of all samples, 7.7% of positive samples), SGARs were found in nearly all positive samples

(76/78, 97.4%), with bromadiolone being detected most frequently (n=57, 73.1% of positive samples).

Concentrations of individual compounds ranged up to 231.4 ng/g ww (442.1 pmol/g ww; brodifacoum, Red kite) (Table 2). Brodifacoum had the highest median concentration, followed in descending order by difenacoum, bromadiolone and difethialone (Figure 2). However, concentrations for these 4 SGARs were not different (Kruskal-Wallis $\chi^2=5.40$, $df=3$, $p=0.1450$). Chlorophacinone levels were lower when compared to each of these SGARs (Kruskal-Wallis rank sum test, $p<0.0001$ followed by pairwise Wilcoxon test with Bonferonni correction: chlorophacinone vs brodifacoum or bromadiolone, or difenacoum or difethialone, $p<0.0001$ for each comparison).

Only 21 individuals (13.5% of samples) had summed SGAR concentrations in liver exceeding 100 ng/g ww (see Table 2 for the details of prevalence per species). When this 100 ng/g ww threshold of summed SGARs for all samples was examined on a molar basis (i.e., using brodifacoum as a reference, 100 ng brodifacoum/g liver ww=191 pmol/g liver ww), these same 21 individuals had summed SGAR molar values exceeding 191 pmol/g ww. Only 7 birds had a concentration of an individual SGAR above the commonly used threshold of 100 ng/g ww (i.e., 9% of the positive samples).

3.2.2 Factors affecting AR exposure

3.2.2.1 Foraging behaviour

Anticoagulant rodenticide residues were more frequently detected in predatory birds (33 of 40 samples, 82.5%) than in scavenging birds (45 of 116 samples, 38.8%) (Chi-squared test, $\chi^2=21.01$, $df=1$, $p <0.001$). The summed concentration of SGARs was also greater in predators than in scavengers (t-test, $t=5.45$, $df=41$, $p<0.0001$, 95% confidence interval (CI) for difference: 52.9 - 115.2 ng/g ww), averaging 94.57 ng/g ww in predators vs 10.48 ng/g ww in scavengers (Figure 3B). Nevertheless, while concentrations of SGARs were low for the majority of scavengers, levels of summed SGARs in 16 of 116 samples (13.8%) were outliers (values above Quartile 3 + 1.5x interquartile range), with 12 (10.3%) being extreme points (Quartile 3+ 3x interquartile range). For these 12 individuals with extreme values (6 Griffon vultures, 4 Cinereous vultures and 2 Bearded vultures), summed SGAR concentrations in liver ranged from 30.2 to 169.6 ng/g ww (57.7 - 338.1 pmol/g ww), with 4 individuals exceeding 100 ng/g ww (Supplemental Table S2).

3.2.2.2 Number of ARs detected

For liver samples with quantifiable AR residues, 64.1% (n=50 of 78) contained two or more compounds. Multiple AR residues were more frequently present in predatory birds (28 of 33, 82.5%) than in scavenging birds (22 of 45, 48.9%) (Chi-squared test, $\chi^2=9.19$, $df=1$, $p=0.0024$). Summed SGAR

concentrations were higher in birds with multiple ARs (Wilcoxon test, $W=91.5$, $p<0.0001$), and among the 21 birds (including 4 scavenger birds) with summed SGARs concentration above 100 ng/g ww, all had multiple SGAR residues, with 16 of them exposed to the four SGARs, and 2 of these 16 samples also containing chlorophacinone residues.

3.2.2.3 Species

The concentration of summed SGARs differed among species with sample sizes ≥ 5 individuals (Kruskal-Wallis rank sum test, $X^2=63.45$, $df=5$, $p<0.001$). Levels were greater in Golden eagles and Red kites compared to Bearded, Cinereous and Griffon vultures, respectively (pairwise Wilcoxon test with Bonferonni correction: Golden eagle vs vulture species $p=0.0241$, 0.0223 and <0.001 , and for Red kite vs vulture species $p=0.0100$, 0.0440 and <0.001) (Figure 3A), further supporting the aforementioned difference in exposure between predatory and scavenger birds.

3.2.2.4 Other factors

Concentrations of summed SGARs did not differ between sexes (t-test, $t=-1.014$, $df=102.96$, $p=0.3132$). Birds were categorized by the geographic region (i.e., department) where they were found, but there was no difference among departments (sample size ≥ 5 individuals) in summed SGAR concentrations for either scavenging (5 departments, Kruskal-Wallis $X^2=4.0515$, $df=4$, $p=0.3991$) or predatory birds (2 departments, Wilcoxon test, $W=32$, $p=0.3690$).

3.3. Temporal trends of AR exposure

A decreasing trend in the proportion of individuals exposed to chlorophacinone was observed (Fisher's exact test, $p=0.0041$, $df=2$) when birds were grouped according to three key periods of changing patterns of AR use ($n=3$ of 17 for 2008-2010, $n=2$ of 24 for 2011-2013, and $n=1$ of 115 for 2014-2019), with a significant difference between 2008-2010 and 2014-2019 (pairwise comparison of proportions using Fisher's test with Bonferroni correction, $p=0.0213$, $df=1$, Odds Ratio =0.043 [0.0008-0.5747]) (Figure 4). In contrast, an increasing trend for brodifacoum was observed among these 3 key periods (Fisher's exact test, $p=0.0398$, $df=2$; but no difference for pairwise comparisons). For the other ARs, hepatic residue concentrations were similar among these 3 periods (Fisher's exact test for bromadiolone, $p=0.5389$; for difenacoum, $p=0.378$; for difethialone, $p=0.2743$; for summed SGAR, $p=0.2609$).

3.4. Evidence of AR intoxication

Of 156 birds tested for ARs, only 130 were examined for the presence of haemorrhage at necropsy because of carcass decomposition of the 26 other specimens. Eighty-eight (88) of those 130 birds displayed signs of haemorrhage (67.7%). None were initially diagnosed with AR toxicosis, but for 9

birds, cause of death was undetermined. Six (6) of those 9 birds were positive for ARs: 2 had low levels of summed SGARs (2.1 and 2.2 ng/g ww) and were not further considered, but the remaining 4 birds (all Red kites) had summed SGAR levels ranging from 27.3 to 191.9 ng/g ww. Levels of ARs and the clinical picture for those 4 individuals are described in Table 3 and Figure 5, respectively. While the clinical picture does not favour coagulopathy in birds 1 and 2, lesions reported in birds 3 (Figure 5) and 4, combined with high levels of summed SGARs, are suggestive of AR toxicosis in those birds (2/156, i.e., 1.3% of tested birds actually died of AR toxicosis).

There was no difference in summed SGAR concentrations between birds with or without haemorrhage (non-parametric Wilcoxon rank Test, $W=1681$, $p=0.3814$). For the remaining subset of birds excluding those with trauma and electrocution, summed SGAR concentrations did not differ between those with or without apparent haemorrhage for all birds (Wilcoxon rank Test, $W=365.5$, $p=0.2584$) and for the subset of species with ≥ 5 individuals (i.e., Griffon vulture, Cinereous vulture and Red kite - Wilcoxon rank test, $W=103$, 6 and 10, respectively, and p -values=0.4523, 1 and 1, respectively). When examining data for only those birds with cause of death classified as "Unknown" ($n=20$; avoiding bias), summed SGAR concentrations did not differ between those with or without apparent haemorrhage (Wilcoxon test, $W=49$, $p=1$).

No difference was found between summed SGARs >100 ng/g and presence of haemorrhages, for samples involving all individuals (Chi-squared test, $\chi^2=0.057$, $df=1$, p -value=0.8117) or when excluding bias and keeping only birds with "Unknown" cause of death ($n=13$; Fisher's Exact test, $OR=0.527$, $p=1$).

Thirty-nine (39) of the 130 birds examined for the presence of haemorrhages died from trauma, and 35/39 displayed signs of haemorrhage (i.e., 89.7% of birds with trauma). AR exposure was detected in 15/35 birds, with 7 birds having summed SGARs concentrations ≥ 100 ng/g ww. No relationship was apparent between AR exposure and presence of haemorrhage in birds that died from trauma (Fisher's Exact test, $OR=0.756$, $p=1$).

3.5 Other contaminants

Lead concentration was determined in 64 liver samples representing 8 species. Evidence of elevated Pb exposure (>6 $\mu\text{g/g dw}$) was apparent in 11 individuals (17.2%) and levels exceeding the threshold of severe/lethal poisoning (>30 $\mu\text{g/g dw}$) occurred in 4 individuals (6.3%). In the necropsy reports, lead intoxication was described as the suspected cause of death for these 4 individuals. Of the liver samples with elevated Pb exposure (>6 $\mu\text{g/g dw}$, $n=11/64$), 9 (81.2%) were also positive for ARs. All ARs detected were SGARs, with summed concentrations ranging from 2.5 to 224 ng/g ww. Seven (7) individuals had multiple SGARs, and 3 of them displayed summed SGAR levels >100 ng/g. Pb

intoxication was suspected in 3 of those birds with multiple SGAR exposure, and the 4 others died from electrocution (n=3) or from trauma (n=1).

Broad toxicological screening was performed on 126 birds, of which 18 exhibited positive results. For those birds, it was concluded that cause of death was consistent with pesticide or pharmaceutical intoxication (18/126, 14.3%). Carbofuran was detected in 13 samples (13/18, i.e., 72.2% of intoxicated birds – 10.3% of screened birds) and mevinphos in 4 samples (4/18, 22.2% of intoxicated birds – 3.2% of screened birds). One bird was positive for pentobarbital that had not been euthanised, potentially from consumption of tissue from euthanized livestock that had been mistakenly dropped off at a feeding station. Of these 18 positive samples, 12 had been analysed for AR residues and 9 (75.0%) of these were positive (SGARs present in 7, 58.3%). Summed SGAR concentrations ranged from 3.0 to 213.5 ng/g ww. Multiple SGARs were found in 5 samples.

4. DISCUSSION

4.1. Causes of death of the study population

Scavengers, and especially Griffon vultures, were the most frequently represented samples. This is likely due to a sampling bias, as vultures are widely monitored in France, and Griffon vultures were the first to be reintroduced starting in the 1980s through several programs and National Action Plans (Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer, 2017) resulting in a large population (n=1,544 reproductive pairs in 2014, with census in the Pyrenees counting 1,254 reproductive pairs in 2019). Another likely source of bias was apparent when comparing numbers of samples collected over the years (more samples from 2016 to 2019) as the LIFE GYPCONNECT program was most active doing carcass collection, necropsy and toxicological analyses during that period.

The principal causes of death reported for all birds were trauma (28.6% of all samples) and electrocution (20%). Trauma was often related to the collision of the bird with a wind turbine, vehicle or power line. Collision with wind turbines is a well-known threat to wild birds (Barrios and Rodríguez, 2004; Hunt et al., 2017), and was reported to account for up to 41% of casualties in areas directly surrounding wind farms. Collision with power lines results either in trauma or electrocution, and represents another major threat for wild birds (Barrientos et al., 2012; Jenkins et al., 2010).

4.2. Characterizing exposure to ARs in wild birds

4.2.1. Prevalence of AR exposure in raptors from France

All available liver samples collected from dead raptors were systematically analysed, without any prejudgment of potential AR exposure. This systematic monitoring may allow less bias in the estimation of the prevalence of AR exposure than incident-based surveillance that is sometimes performed and certainly overestimates this prevalence (Millot et al., 2017; Murray, 2017, 2011;

Sánchez-Barbudo et al., 2012). Yet, half of the samples (78/156) were positive for ARs. This is consistent with the mean exposure rate calculated in the review from Lopez-Perea and Mateo (2018), who estimated a prevalence of ARs in raptors of 58% (López-Perea and Mateo, 2018). More recent data from the UK indicates a higher prevalence of 66.8% in common Kestrels (Roos et al., 2021). However, both those rates are based on results obtained from predatory birds. In our study, prevalence of AR exposure in predatory birds (82.5%) was higher than previously reported rates, but was calculated based on a small sample size (n=40). Prevalence in scavenger birds (38.8% - n = 116) was lower, but still quite substantial. To our knowledge, this is the first report of prevalence of AR exposure in scavenging birds calculated on a large sample size. Future work focusing on the prevalence of AR exposure in scavenging birds could add clarity this observation.

Detected ARs were mainly SGARs, which is consistent with their greater environmental persistence when compared to FGARs (Buckle et al., 1994; Giraudoux et al., 2006). Warfarin and flocoumafen were not detected in any of the samples, and they were not sold in France during the study period (<https://simmbad.fr/public/servlet/accueilGrandPublic.html>). While coumatetralyl is authorized for use in France, it was not detected.

Levels of SGARS were mostly low, with only 13.5% of samples above the commonly used threshold of 100 ng/g ww. This suggests a relatively prevalent exposure of wild birds in the zone of the study (i.e. southeastern France), but mainly at low levels.

4.2.1. Factors affecting AR exposure

4.2.1.2. Exposure of predatory vs scavenging birds: different pathways?

As expected, the proportion of AR-positive samples was greater in predators than scavengers. Predatory birds are likely to be directly exposed to ARs through consumption of intoxicated rodents, which may be weakened and motionless, lose their nocturnal disposition and positive thigmotactic behaviour, and are therefore easy prey (Cox and Smith, 1992; Frankova et al., 2017; Littin et al., 2000). Exposure of predatory birds could also occur through the consumption of AR-contaminated non-target mammals, reptiles, and birds (e.g., passerines, waterbirds) (Hindmarch and Elliott, 2018; Nakayama et al., 2019; Rattner et al., 2014). It should however be noted that one limit of this study was that the opportunistic nature of some predator species (e.g., Golden eagle is a facultative scavenger obtaining much of its diet through predation) was not taken into account, as well as some species-specific feeding habits (e.g., Short-toed snake eagle whose diet is mainly reptiles, not rodents).

Even if prevalence of AR exposure was lower in scavengers, some of them (10%) displayed high levels of summed SGARs. The AR exposure pathway for scavengers is not obvious. In the areas of carcass

collection, reintroduced scavengers forage at feeding stations stocked with dead livestock by local farmers and with butchery remains (including bones for Bearded vultures) by field agents. While accidental primary AR exposure of domestic ruminants can occur (e.g., recently described poisoning event in ewes) (Moriceau et al., 2020) based on the sources of food and vigilance, substantial AR exposure at such supplemental feeding “vulture restaurants” seems unlikely. As vulture populations are growing in the area studied, feeding stations may not provide adequate food resources, resulting in some birds feeding on wild carrion. Presence of numerous illegal hunting “dumps” have been reported in the study area (Florence Buronfosse, National Centre for Veterinary Toxicological Information [CNITV], oral communication, 2021), and scavenging of the remains of large wild hunted mammals (e.g., boars) that may have consumed AR baits (Alabau et al., 2020) could be a source of exposure. This could especially be the case for Griffon vultures that are keen on viscera. Rodents might occasionally be part of the diet of Cinereous vultures (Xiao-Ti, 1991), and of young Bearded vultures, when food resources are scarce (Florence Buronfosse, National Centre for Veterinary Toxicological Information [CNITV], oral communication, 2021). Further investigation of feeding habits of vultures in the study area are needed to better understand AR exposure pathways.

4.2.1.3. Acute vs chronic multiple exposure

Less than 10% of positive samples displayed a concentration of an individual SGAR above the commonly used threshold of 100 ng/g ww, and none of the sampled birds presented evidence of AR toxicosis, suggesting that massive acute exposure was uncommon in raptors in our study (López-Perea and Mateo, 2018). The fact that high concentrations of a single ARs are rarely found could also suggest that much of the ingested AR is quickly eliminated, with only a small fraction persisting (Rached et al., 2020). This deserves further investigation through toxicokinetic studies.

In contrast, all birds with summed SGARs above 100 ng/g ww had multiple AR residues (i.e. up to 4 SGARs) and more than half of positive samples had residues of 2 or more ARs. This is consistent with other publications (Albert et al., 2010; Stone et al., 1999; Thomas et al., 2011), and suggests that chronic repeated exposure is a more prevalent pathway of exposure in wild birds, which can lead to sublethal adverse effects (Rattner and Harvey, 2021).

4.2.1.4 Other factors affecting AR exposure

Sex ratio of adult bird populations, including raptors, has received limited attention, but there is some evidence that in free-ranging populations males outnumber females (Donald, 2007). Notably, for the Andean condor (*Vulture gryphus*), an age-dependent skewed sex ratio favoring mature males has been described, with a proposed explanation that immature females forage in plains which might enhance exposure to human threats such as environmental contaminants (Lambertucci et al., 2012).

However, in the present study, involving many different species of raptors, no such sex-based pattern of AR exposure was apparent, which is generally similar to observations in another AR exposure study (Murray, 2011).

While human population density, urbanization, density of livestock and acreage of crops have been observed to influence the magnitude of SGAR exposure (Coourdassier et al., 2019; López-Perea et al., 2019), no geographic trend for scavenging or predatory birds was apparent in the present study. This is likely a deficiency of recordkeeping for habitat type where carcasses were discovered (e.g., urban, suburban, agriculture, rural, natural area) could be addressed in this monitoring scheme, using available public data on land use.

4.3. Effect of public policies on AR exposure

Following the restriction of chlorophacinone use as a PPP in agricultural settings at the end of 2010, the frequency of detection in liver of raptors decreased. However, this trend should be viewed with caution as it is based on few detections. Furthermore, chlorophacinone is seemingly less persistent than several SGARs in liver (Vandenbroucke et al., 2008) which may limit its probability of detection. Bromadiolone was the most frequently detected SGAR in this study, and it may partly be explained by the fact that between 2010 and 2020 it was the only AR authorized in France as a PPP. Continued monitoring of bromadiolone since its 2020 withdrawal as a PPP would reveal how frequency of detection and residue concentrations change over time in non-target raptors.

While from 2013, use of bait stations was made mandatory for ARs used as biocides (Berny et al., 2014; Nakagawa et al., 2015; Suárez and Cueto, 2018), the trend observed in the present study seemed to be an increase in the frequency of detection of SGARs (Figure 2), with this being significant for brodifacoum. These findings suggest that further measures may need to be considered to mitigate the risk of exposure in non-target fauna to SGARs used as biocides. It also suggests that exposure to PPP in agricultural settings is not the only pathway for AR exposure of wild birds, especially considering that their use is currently banned in the EU (EU Pesticides database, https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en, access on 14 October 2021); use of AR biocides in urban areas and cattle farms could even be the principal exposure route for wildlife (López-Perea et al., 2019). Such an increase in the use of SGARs might be related to the occurrence of resistance to ARs in rodents pest species (Blažić et al., 2018; Boitet et al., 2018; Buckle et al., 1994; Lefebvre et al., 2016; Marquez et al., 2019; McGee et al., 2020), and to the absence of efficient alternatives for pest control. Differences in potency and toxicity between stereoisomers of SGARs could be a promising direction for investigation to develop effective and more “eco-friendly” rodenticides (Damin-Pernik et al., 2016; Fourel et al., 2017b, 2021; Lefebvre et al., 2020).

4.4. Diagnosis of AR toxicosis

While many birds were exposed to ARs, toxicosis was suspected in only 2 of 156 individuals evaluated for rodenticide residues (i.e., 1.3% of sampled birds, 2.6% of birds with detectable AR residues). Suspicion of AR toxicosis in those 2 birds was established as they displayed macroscopic hemorrhage and clearly elevated AR residues (i.e., 96.2 and 191.9 ng summed SGARs/g ww) (Murray, 2018), and no other obvious cause of death was described in necropsy records. Using these criteria, 2 other birds might be suspected of succumbing from AR toxicosis (Table 3), yet residue concentrations were low and signs of hemorrhage were less apparent, and clotted blood was observed in the cardiac cavities of both individuals. This rate of toxicosis is consistent with prevalence reported in a recent study in Bald and Golden eagles (4% of eagles tested actually dying from AR toxicosis, Niedringhaus et al. 2021), suggesting that mortality directly related to AR consumption is rather low in non-target birds of prey. However, other studies in the northeastern United States involving several species of raptors indicate a greater frequency of AR toxicosis, with incidence of exposure increasing in recent years (Murray, 2011, 2017, 2020).

In contrast to these few suspected cases of AR toxicosis, the presence of hemorrhage was observed in a high proportion of birds (88/130, 67.7%), but most (71/88) were diagnosed with causes of death that result in hemorrhage (e.g., trauma, electrocution, infectious processes). No excessive bleeding from minor wounds was documented in any of the cases, that might be suggestive of impaired coagulation (Murray, 2018). While some publications may suggest increased susceptibility to trauma in AR-intoxicated animals (Elmeros et al., 2011; Fournier-Chambrillon et al., 2004) no relationship was apparent between levels of AR exposure and presence of haemorrhage in birds that were classified as dying from trauma.

Our observations illustrate the difficulty of diagnosing AR toxicosis during post-mortem examination, especially for heterogeneous samples of wildlife with a high prevalence of other causes of death involving hemorrhage. No histopathological examination was performed on the samples to detect microscopic evidence of hemorrhage or hypoxic damage to tissues, as suggested by several previous studies (Murray, 2011, 2018; Niedringhaus et al., 2021; Rattner et al., 2011). However, this type of examination is not appropriate if carcasses are not fresh. Moreover, the codification of the presence/absence of hemorrhage was based on the personal interpretation of the senior author's review of descriptive data in each necropsy report based on keywords (i.e., "haemorrhage", "bleeding", "anaemia", "bruising", "haematoma", "blood"). Efforts are underway to improve the coding of necropsy observations in our internal wildlife mortality database.

To assist with diagnosis of AR toxicosis, many diagnosticians were led to the implementation of a toxicity threshold for summed SGARs, with a commonly reported threshold of 100 ng/g ww (Newton et al., 1990). However, in the present dataset this threshold concentration did not seem to reveal many individuals that died from AR toxicosis. In addition, no significant difference could be found when excluding potentially confounding factors (e.g., trauma and electrocution as cause of death) or by the grouping of samples by species to account for potential species-specific differences in AR sensitivity that limit the utility of this threshold (Rattner and Harvey, 2021). Drawbacks of the present study and dataset that limit our availability to examine the AR toxicity threshold for wild birds include small sample size for many of the species, and unlike other studies (e.g., Thomas et al. 2011, Murray 2020), few individuals which seemingly died from AR toxicosis sequelae including coagulopathy. Moreover, carcasses could be more or less decomposed, possibly affecting AR concentration estimates in sampled livers (Valverde et al., 2020). It is noteworthy that some have suggested that such a residue threshold may not be a relevant diagnostic tool for AR toxicosis, as it does not address sublethal effects and the potential consequences of bioaccumulation from repeated exposures (Erickson and Urban 2004, Rattner and Harvey 2021). Development of additional biomarkers for AR effects could be useful in monitoring the effect of rodenticides on non-target fauna (Rached et al., 2020).

4.5. Concomitant exposure to other contaminants

In our study, most of the samples displaying elevated Pb exposure ($>6 \mu\text{g/g dw}$) were also positive for SGARs. The majority of those birds with exposure to both AR and Pb died from either trauma or electrocution. Combined sequential exposure to both lead and AR could have increased the risk of mortality in those birds, as these contaminants may impair flight coordination and/or spatial recognition (Herring and Eagles-Smith, 2017; Murray, 2011; Rattner et al., 2011). Furthermore, through different mechanisms of action, both lead and ARs can cause anaemia (Rattner and Mastrota, 2018). Further investigations are needed to characterise such potential “cocktail effects” of environmental contaminants commonly encountered by wild birds.

5. CONCLUSION

This study aimed at characterizing exposure to ARs in a large yet heterogeneous sample of birds of prey from southeastern France collected over a 12 year period. Results were generally consistent with other reports, documenting a rather high prevalence of AR exposure (mainly SGARs), usually low levels of individual ARs and summed of SGARs, and occasionally with a few birds seemingly succumbing to AR toxicosis. Multiple exposure was quite frequent, raising the issue of sub-lethal chronic effects related to repeated exposure. As expected, levels of ARs were higher in predators,

but some scavengers also displayed high levels for which a pathway of exposure could not be fully elucidated. It was also noted that current public policies had a limited effect on mitigating AR exposure; the development of more eco-friendly ARs could be an approach to limit AR contamination of non-target fauna. The study also confirmed that diagnosis of AR toxicosis is a complex issue, and establishing a threshold like the widely used value of 100 ng/g ww may not be ideal. Future research exploring biomarkers of effect rather than just exposure, could permit discrimination of AR exposure and toxicosis. The presence of both ARs and Pb in some samples demonstrates multiple contaminant exposures that could have the potential to result in additive or synergistic effects.

6. ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all the field agents who took part to the carcass collection for this study, especially the agents from the LIFE GYPCONNECT. We thank Jhon López-Perea for reviewing a draft of this manuscript. Any use of trade, firm or product names is for descriptive purposes only and does not imply endorsement by the U.S. Government. The contribution of Barnett Rattner to this study was supported by the Contaminant Biology Program of the U.S. Geological Survey.

7. REFERENCES

- Alabau, E., Mentaberre, G., Camarero, P.R., Castillo-Contreras, R., Sánchez-Barbudo, I.S., Conejero, C., Fernández-Bocharán, M.S., López-Olvera, J.R., Mateo, R., 2020. Accumulation of diastereomers of anticoagulant rodenticides in wild boar from suburban areas: Implications for human consumers. *Sci. Total Environ.* 738, 139828. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139828>
- Albert, C.A., Wilson, L.K., Mineau, P., Trudeau, S., Elliott, J.E., 2010. Anticoagulant rodenticides in three owl species from Western Canada, 1988–2003. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 451–459. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9402-z>
- Allen, G.T., Veatch, J.K., Stroud, R.K., Vendel, C.G., Poppenga, R.H., Thompson, L., Shafer, J.A., Braselton, W.E., 1996. Winter poisoning of coyotes and raptors with furadan-laced carcass baits. *J. Wildl. Dis.* 32, 385–389. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-32.2.385>
- Badry, A., Krone, O., Jaspers, V.L.B., Mateo, R., García-Fernández, A., Leivits, M., Shore, R.F., 2020. Towards harmonisation of chemical monitoring using avian apex predators: Identification of key species for pan-European biomonitoring. *Sci. Total Environ.* 731, 139198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139198>
- Barrientos, R., Ponce, C., Palacín, C., Martín, C.A., Martín, B., Alonso, J.C., 2012. Wire marking results in a small but significant reduction in avian mortality at power lines: a BACI designed study. *PLoS ONE* 7, e32569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032569>
- Barrios, L., Rodríguez, A., 2004. Behavioural and environmental correlates of soaring-bird mortality at on-shore wind turbines: Bird mortality at wind power plants. *J. Appl. Ecol.* 41, 72–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2004.00876.x>
- Bean, T.G., Rattner, B.A., 2018. Environmental contaminants of healthcare origin: exposure and potential effects in wildlife, in: *Health Care and Environmental Contaminants*. Elsevier, pp. 87–122.

- Berny, P., Esther, A., Jacob, J., Prescott, C., European Commission, Directorate-General for the Environment, 2014. Study on risk mitigation measures for anticoagulant rodenticides as biocidal products: final report. Publications Office, Luxembourg.
- Blažič, T., Jokić, G., Götz, M., Esther, A., Vukša, M., Đedović, S., 2018. Brodifacoum as a first choice rodenticide for controlling bromadiolone-resistant *Mus musculus*. *J. Stored Prod. Res.* 79, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.08.006>
- Boitet, M., Hammed, A., Chatron, N., Debaux, J.V., Benoit, E., Lattard, V., 2018. Elevated difenacoum metabolism is involved in the difenacoum-resistant phenotype observed in Berkshire rats homozygous for the L120Q mutation in the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*Vkorc1*) gene: Resistance to difenacoum of Berkshire rats. *Pest Manag. Sci.* 74, 1328–1334. <https://doi.org/10.1002/ps.4797>
- Botha, C.J., Coetser, H., Labuschagne, L., Basson, A., 2015. Confirmed organophosphorus and carbamate pesticide poisonings in South African wildlife (2009–2014). *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 86, 1329. <https://doi.org/10.4102/jsava.v86i1.1329>
- Buckle, A.P., Prescott, C.V., Ward, K.J., 1994. Resistance to the first and second generation anticoagulant rodenticides—a new perspective. *Vertebr. Pest Conf.* 16 138–144.
- Coeurdassier, M., Villers, A., Augiron, S., Sage, M., Couzi, F.-X., Lattard, V., Fourel, I., 2019. Pesticides threaten an endemic raptor in an overseas French territory. *Biol. Conserv.* 234, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.03.022>
- Cox, P., Smith, R.H., 1992. Rodenticide ecotoxicology: Pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. *Vertebr. Pest Conf.* 15 165–170.
- Cuthbert, R., Taggart, M.A., Prakash, V., Saini, M., Swarup, D., Upreti, S., Mateo, R., Chakraborty, S.S., Deori, P., Green, R.E., 2011. Effectiveness of action in India to reduce exposure of Gyps vultures to the toxic veterinary drug diclofenac. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019069>
- Cuthbert, R.J., Taggart, M.A., Prakash, V., Chakraborty, S.S., Deori, P., Galligan, T., Kulkarni, M., Ranade, S., Saini, M., Sharma, A.K., Shringarpure, R., Green, R.E., 2014. Avian scavengers and the threat from veterinary pharmaceuticals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0574>
- Damin-Pernik, M., Espana, B., Besse, S., Fourel, I., Caruel, H., Popowycz, F., Benoit, E., Lattard, V., 2016. Development of an Ecofriendly Anticoagulant Rodenticide Based on the Stereochemistry of Difenacoum. *Drug Metab. Dispos.* 44, 1872–1880. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.071688>
- Descalzo, E., Camarero, P.R., Sánchez-Barbudo, I.S., Martínez-Haro, M., Ortiz-Santaliestra, M.E., Moreno-Opo, R., Mateo, R., 2021. Integrating active and passive monitoring to assess sublethal effects and mortality from lead poisoning in birds of prey. *Sci. Total Environ.* 750, 142260. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142260>
- Donald, P.F., 2007. Adult sex ratios in wild bird populations: Adult sex ratios in birds. *Ibis* 149, 671–692. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00724.x>
- Elmeros, M., Christensen, T.K., Lassen, P., 2011. Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats *Mustela erminea* and weasels *Mustela nivalis* from Denmark. *Sci. Total Environ.* 409, 2373–2378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.03.006>
- Erickson, W., Urban, D., 2004. Potential risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: a comparative approach. United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticides Programs Environmental Fate and Effects Division.
- Espín, S., García-Fernández, A.J., Herzke, D., Shore, R.F., van Hattum, B., Martínez-López, E., Coeurdassier, M., Eulaers, I., Fritsch, C., Gómez-Ramírez, P., Jaspers, V.L.B., Krone, O., Duke, G., Helander, B., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., van den Brink, N.W., 2016. Tracking pancontinental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use? *Ecotoxicology* 25, 777–801. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1636-8>

- European Regulation No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj>
- Finkelstein, M.E., Doak, D.F., George, D., Burnett, J., Brandt, J., Church, M., Grantham, J., Smith, D.R., 2012. Lead poisoning and the deceptive recovery of the critically endangered California condor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11449–11454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203141109>
- Fourel, I., Couzi, F.-X., Lattard, V., 2021. Monitoring the hepatic residues of cis- and trans-diastereoisomers of second generation anticoagulant rodenticides reveals a different bioaccumulation of diastereoisomers in the food chain of the Réunion harrier (*Circus maillardi*). *Sci. Total Environ.* 146287. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146287>
- Fourel, I., Damin-Pernik, M., Benoit, E., Lattard, V., 2017a. Core-shell LC–MS/MS method for quantification of second generation anticoagulant rodenticides diastereoisomers in rat liver in relationship with exposure of wild rats. *J. Chromatogr. B* 1041–1042, 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.028>
- Fourel, I., Damin-Pernik, M., Benoit, E., Lattard, V., 2017b. Cis-bromadiolone diastereoisomer is not involved in bromadiolone Red Kite (*Milvus milvus*) poisoning. *Sci. Total Environ.* 601–602, 1412–1417. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.011>
- Fournier-Chambrillon, C., Berny, P.J., Coiffier, O., Barbedienne, P., Dassé, B., Delas, G., Galineau, H., Mazet, A., Pouzenc, P., Rosoux, R., Fournier, P., 2004. Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implications for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *J. Wildl. Dis.* 40, 688–695. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.688>
- Frankova, M., Stejskal, V., Aulicky, R., 2017. Suppression of food intake by house mouse (*Mus musculus*) following ingestion of brodifacoum-based rodenticide bait. *Crop Prot.* 100, 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.06.017>
- Giraudoux, P., Coeurdassier, M., Couval, G., Jacquot, M., Renaude, R., Truchetet, D., Raoul, F., 2012. Sustainable control of grassland small mammals. Presented at the 6th SETAC World Congress and 22nd Europe annual meeting, Berlin.
- Giraudoux, P., Tremollières, C., Barbier, B., Defaut, R., Rieffel, D., Bernard, N., Lucot, É., Berny, P., 2006. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environ. Res.* 102, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.02.008>
- Gómez-Ramírez, P., Shore, R.F., van den Brink, N.W., van Hattum, B., Bustnes, J.O., Duke, G., Fritsch, C., García-Fernández, A.J., Helander, B.O., Jaspers, V., Krone, O., Martínez-López, E., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., 2014. An overview of existing raptor contaminant monitoring activities in Europe. *Environ. Int.* 67, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.004>
- Gómez-Ramírez, P., Blanco, G., García-Fernández, A.J., 2020. Validation of multi-residue method for quantification of antibiotics and NSAIDs in avian scavengers by using small amounts of plasma in HPLC-MS-TOF. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17,4058. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114058>
- Goulois, J., Lambert, V., Legros, L., Benoit, E., Lattard, V., 2017. Adaptive evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides. *Ecol. Evol.* 7, 2767–2776. <https://doi.org/10.1002/ece3.2829>
- Helsel DR. 2005. Nondetects and Data Analysis Statistics for Censored Environmental Data. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Herring, G., Eagles-Smith, C.A., 2017. Characterizing golden eagle risk to lead and anticoagulant rodenticide exposure: A review. *J. Raptor Res.* 51, 273–292. <https://doi.org/10.3356/JRR-16-19.1>
- Hindmarch, S., Elliott, J.E., 2018. Ecological factors driving uptake of anticoagulant rodenticides in predators, in: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife, Emerging Topics in Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 229–258. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9_9

- Hunt, W.G., Wiens, J.D., Law, P.R., Fuller, M.R., Hunt, T.L., Driscoll, D.E., Jackman, R.E., 2017. Quantifying the demographic cost of human-related mortality to a raptor population. *PLOS ONE* 12, e0172232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172232>
- Jenkins, A.R., Smallie, J.J., Diamond, M., 2010. Avian collisions with power lines: A global review of causes and mitigation with a South African perspective. *Bird Conserv. Int.* 20, 263–278. <https://doi.org/10.1017/S0959270910000122>
- Krone, O., 2018. Lead poisoning in birds of prey, in: Sarasola, J.H., Grande, J.M., Negro, J.J. (Eds.), *Birds of Prey: Biology and Conservation in the XXI Century*. Springer International Publishing, Cham, pp. 251–272. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73745-4_11
- Lambertucci, S.A., Carrete, M., Donázar, J.A., Hiraldo, F., 2012. Large-scale age-dependent skewed sex ratio in a sexually dimorphic avian scavenger. *PLOS ONE* 7, e46347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046347>
- Lefebvre, S., Benoit, E., Lattard, V., 2016. Comparative biology of the resistance to vitamin K antagonists: an overview of the resistance mechanisms, in: Basaran, O., Biteker, M. (Eds.), *Anticoagulation Therapy*. InTech, France. <https://doi.org/10.5772/64204>
- Lefebvre, S., Fourel, I., Chatron, N., Caruel, H., Benoit, E., Lattard, V., 2020. Comparative biological properties of the four stereoisomers of difethialone, a second-generation anticoagulant rodenticide, in rats: development of a model allowing to choose the appropriate stereoisomeric ratio. *Arch. Toxicol.* 94, 795–801. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02662-0>
- Littin, K.E., O'Connor, C.E., Eason, C.T., 2000. Comparative effects of brodifacoum on rats and possums. *N. Z. Plant Prot.* 53, 310–315. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2000.53.3701>
- López-Perea, J.J., Camarero, P.R., Sánchez-Barbudo, I.S., Mateo, R., 2019. Urbanization and cattle density are determinants in the exposure to anticoagulant rodenticides of non-target wildlife. *Environ. Pollut.* 244, 801–808. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.101>
- López-Perea, J.J., Mateo, R., 2018. Secondary exposure to anticoagulant rodenticides and effects on predators, in: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife, Emerging Topics in Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 159–193. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9_7
- Marquez, A., Khalil, R.A., Fourel, I., Ovarbury, T., Pinot, A., Rosine, A., Thalmensi, G., Jaffory, G., Kodjo, A., Benoit, E., Lattard, V., 2019. Resistance to anticoagulant rodenticides in Martinique could lead to inefficient rodent control in a context of endemic leptospirosis. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49661-5>
- Mateo, R., 2009. Lead poisoning in wild birds in Europe and the regulations adopted by different countries, in: *Ingestion of Lead from Spent Ammunition: Implications for Wildlife and Humans*. Presented at the *Ingestion of Spent Lead Ammunition: Implications for Wildlife and Humans*, The Peregrine Fund. <https://doi.org/10.4080/ilsa.2009.0107>
- McGee, C.F., McGilloway, D.A., Buckle, A.P., 2020. Anticoagulant rodenticides and resistance development in rodent pest species – A comprehensive review. *J. Stored Prod. Res.* 88, 101688. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101688>
- Millot, F., Decors, A., Mastain, O., Quintaine, T., Berny, P., Vey, D., Lasseur, R., Bro, E., 2017. Field evidence of bird poisonings by imidacloprid-treated seeds: a review of incidents reported by the French SAGIR network from 1995 to 2014. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 5469–5485. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8272-y>
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2007. Avis aux fabricants, distributeurs et utilisateurs de produits phytopharmaceutiques concernant la non-inscription de certaines substances actives à l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil et le retrait des autorisations de produits phytopharmaceutiques contenant ces substances, *Journal Officiel de la République Française*.
- Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer, 2017. Plan National d'Action Vautour fauve - 2017-2026.

- Monclús, L., Shore, R.F., Krone, O., 2020. Lead contamination in raptors in Europe: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Total Environ.* 748, 141437. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141437>
- Moriceau, M.-A., Lefebvre, S., Fourel, I., Benoit, E., Rattner, B.A., Lattard, V., 2020. Accidental chlorophacinone exposure of lactating ewes: Clinical follow-up and human health dietary implications. *Food Chem. Toxicol.* 143, 111518. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111518>
- Murray, M., 2020. Continued anticoagulant rodenticide exposure of red-tailed hawks (*buteo jamaicensis*) in the northeastern United States with an evaluation of serum for biomonitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 39, 2325–2335. <https://doi.org/10.1002/etc.4853>
- Murray, M., 2018. Ante-mortem and post-mortem signs of anticoagulant rodenticide toxicosis in birds of prey, in: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Springer International Publishing, Cham, pp. 109–134. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9_5
- Murray, M., 2017. Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in four species of birds of prey in Massachusetts, USA, 2012–2016, in relation to use of rodenticides by pest management professionals. *Ecotoxicology* 26, 1041–1050. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1832-1>
- Murray, M., 2011. Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in four species of birds of prey presented to a wildlife clinic in Massachusetts, 2006–2010. *J. Zoo Wildl. Med.* 42, 88–97. <https://doi.org/10.1638/2010-0188.1>
- Nakagawa, L., de Masi, E., Narciso, E., Neto, H.M., Papini, S., 2015. Palatability and efficacy of bromadiolone rodenticide block bait previously exposed to environmental conditions. *Pest Manag. Sci.* 71, 1414–1418. <https://doi.org/10.1002/ps.3944>
- Nakayama, S.M.M., Morita, A., Ikenaka, Y., Mizukawa, H., Ishizuka, M., 2019. A review: poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally. *J. Vet. Med. Sci.* 81, 298–313. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0717>
- Newton I, Shore RF, Wyllie I, Birks JDS and Dale L, 1999. Empirical evidence of side-effects of rodenticides on some predatory birds and mammals, in *Advances in Vertebrate Pest Management*, ed. by Cowan DP, Feare CJ, Filander Verlag, Furth, Germany pp 347-367.
- Newton, I., Wyllie, I., Freestone, P., 1990. Rodenticides in British barn owls. *Environ. Pollut.* 68, 101–117. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(90\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90015-5)
- Niedringhaus, K.D., Nemeth, N.M., Gibbs, S., Zimmerman, J., Shender, L., Slankard, K., Fenton, H., Charlie, B., Dalton, M.F., Elsmo, E.J., Poppenga, R., Millsap, B., Ruder, M.G., 2021. Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) and golden eagles (*Aquila chrysaetos*) in the United States. *PLOS ONE* 16, e0246134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246134>
- Pain, D.J., Mateo, R., Green, R.E., 2019. Effects of lead from ammunition on birds and other wildlife: A review and update. *Ambio* 48, 935–953. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01159-0>
- Rached, A., Moriceau, M.-A., Serfaty, X., Lefebvre, S., Lattard, V., 2020. Biomarkers potency to monitor non-target fauna poisoning by anticoagulant rodenticides. *Front. Vet. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.616276>
- Rattner, B.A., Harvey, J.J., 2021. Challenges in the interpretation of anticoagulant rodenticide residues and toxicity in predatory and scavenging birds. *Pest Manag. Sci.* 77, 604–610. <https://doi.org/10.1002/ps.6137>
- Rattner, B.A., Horak, K.E., Warner, S.E., Day, D.D., Meteyer, C.U., Volker, S.F., Eisemann, J.D., Johnston, J.J., 2011. Acute toxicity, histopathology, and coagulopathy in American kestrels (*Falco sparverius*) following administration of the rodenticide diphacinone. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1213–1222. <https://doi.org/10.1002/etc.490>
- Rattner, B.A., Lazarus, R.S., Elliott, J.E., Shore, R.F., van den Brink, N., 2014. Adverse outcome pathway and risks of anticoagulant rodenticides to predatory wildlife. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8433–8445. <https://doi.org/10.1021/es501740n>
- Rattner, B.A., Mastrolta, F.N., 2018. Anticoagulant rodenticide toxicity to non-target wildlife under controlled exposure conditions, in: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A.

- (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife, Emerging Topics in Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 45–86. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9_3
- Rattner, B.A., Volker, S.F., Lankton, J.S., Bean, T.G., Lazarus, R.S., Horak, K.E., 2020. Brodifacoum toxicity in American kestrels (*Falco sparverius*) with evidence of increased hazard on subsequent anticoagulant rodenticide exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 39, 468–481. <https://doi.org/10.1002/etc.4629>
- Roos, S., Campbell, S.T., Hartley, G., Shore, R.F., Walker, L.A., Wilson, J.D., 2021. Annual abundance of common Kestrels (*Falco tinnunculus*) is negatively associated with second generation anticoagulant rodenticides. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02374-w>
- Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R., Mateo, R., 2012. Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Sci. Total Environ.* 420, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.028>
- Stone, W.B., Okoniewski, J.C., Stedelin, J.R., 1999. Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J. Wildl. Dis.* 35, 187–193. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.2.187>
- Suárez, O.V., Cueto, G.R., 2018. Comparison of efficacy of second-generation anticoagulant rodenticides: Effect of active ingredients, type of formulation and commercial suppliers. *Cogent Food Agric.* 4, 1525147. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1525147>
- Swan, G.E., Cuthbert, R., Quevedo, M., Green, R.E., Pain, D.J., Bartels, P., Cunningham, A.A., Duncan, N., Meharg, A.A., Lindsay Oaks, J., Parry-Jones, J., Shultz, S., Taggart, M.A., Verdoorn, G., Wolter, K., 2006. Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biol. Lett.* 2, 279–282. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0425>
- Thomas, P.J., Mineau, P., Shore, R.F., Champoux, L., Martin, P.A., Wilson, L.K., Fitzgerald, G., Elliott, J.E., 2011. Second generation anticoagulant rodenticides in predatory birds: Probabilistic characterisation of toxic liver concentrations and implications for predatory bird populations in Canada. *Environ. Int.* 37, 914–920. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.010>
- Valverde, I., Espín, S., Gómez-Ramírez, P., Navas, I., Sánchez-Virosta, P., Torres-Chaparro, M.Y., Jiménez, P., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J., 2020. Temporal Persistence of Bromadiolone in Decomposing Bodies of Common Kestrel (*Falco tinnunculus*). *Toxics*, 8, 98. <https://doi.org/10.3390/toxics8040098>
- Van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), 2018. *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife, Emerging Topics in Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9>
- Vandenbroucke, V., Bousquet-Melou, A., De Backer, P., Croubels, S., 2008. Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 31, 437–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00979.x>
- Wardrop, D., Keeling, D., 2008. The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br. J. Haematol.* 141, 757–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07119.x>
- Xiao-Ti, Y., 1991. Distribution and status of the Cinereous Vulture *Aegypius monachus* in China. *Birds Prey* 4, 51–56.

Figures

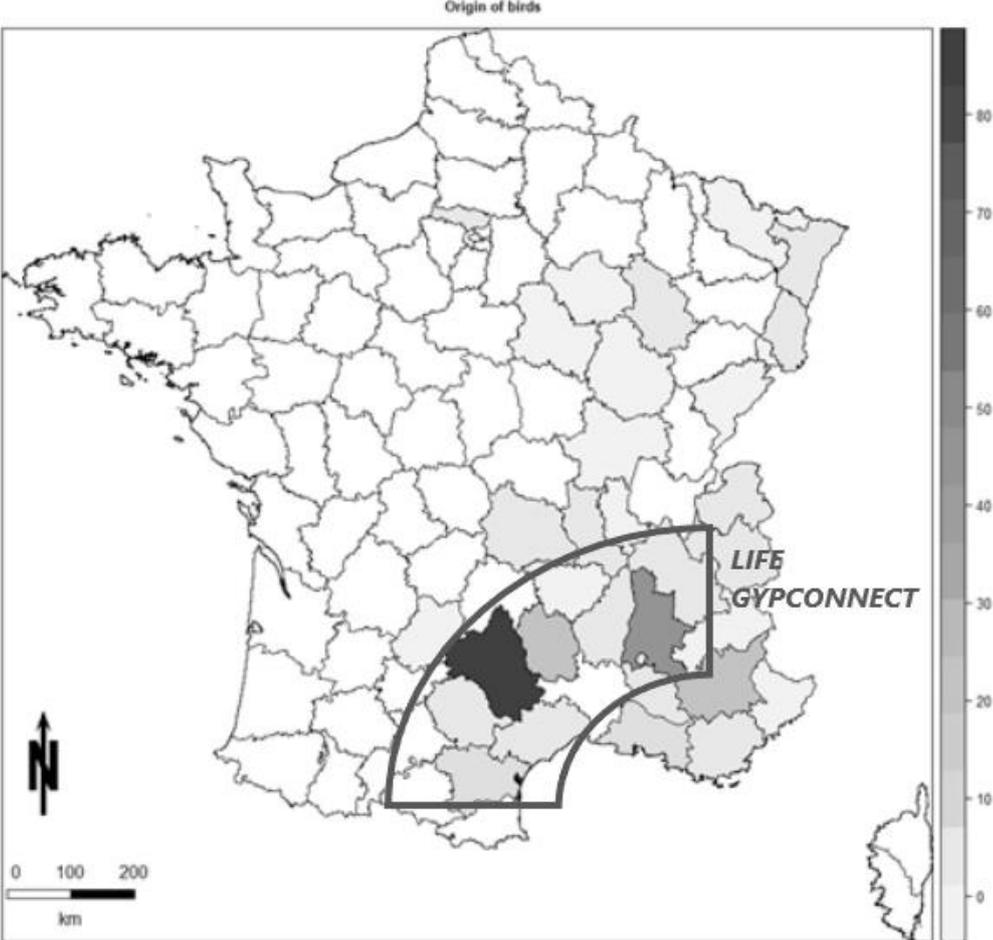


Figure 1: Number of birds collected per department (n=245) (gray frame: working area of LIFE GYPCONNECT)

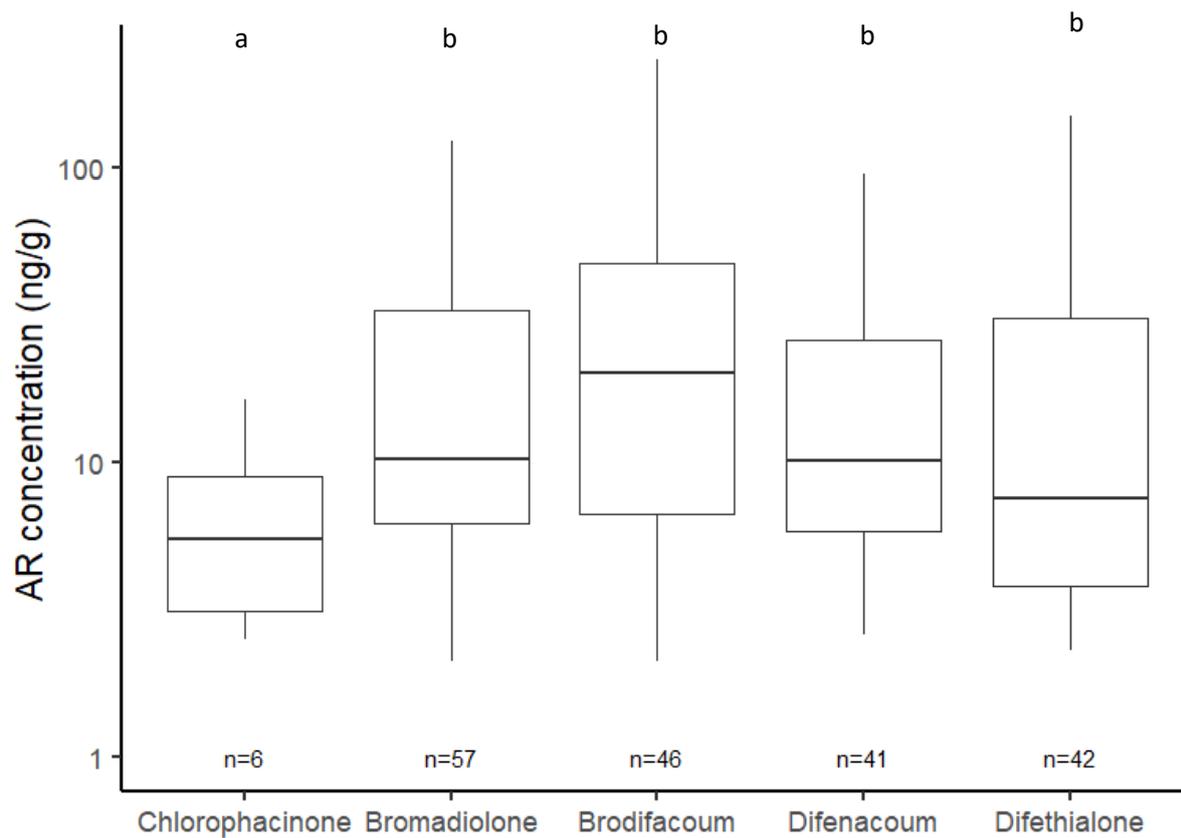
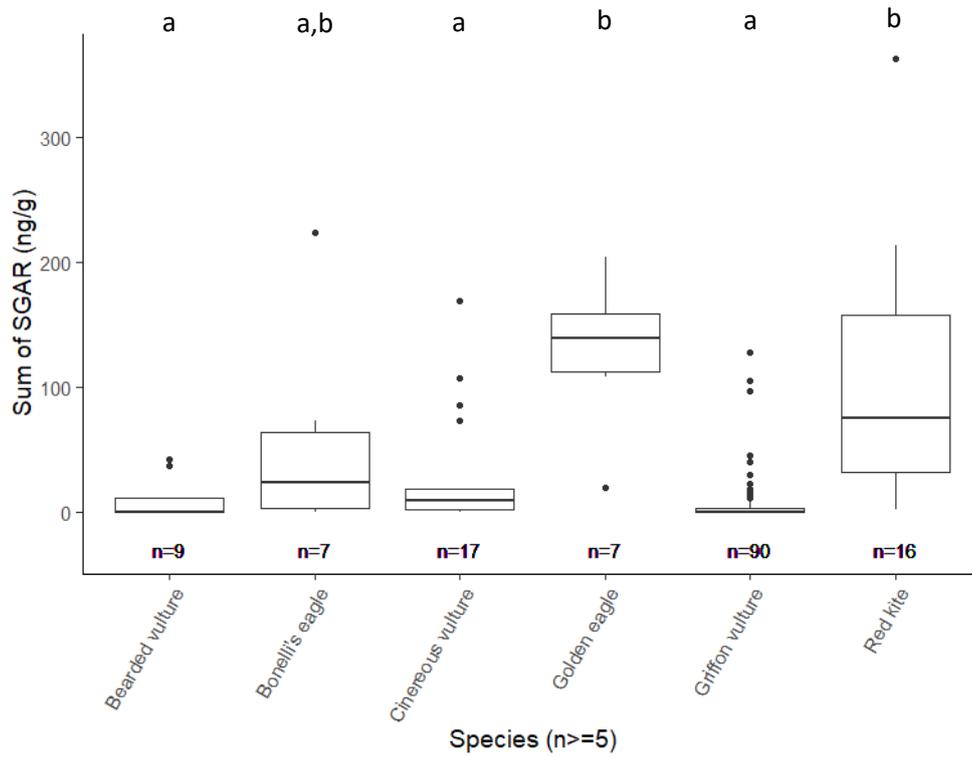


Figure 2: Distribution (boxplot: minimum, first quartile, median, third quartile, and maximum) of detected quantities of each AR in birds; compounds not sharing common letters are different ($p < 0.001$).

A/



B/

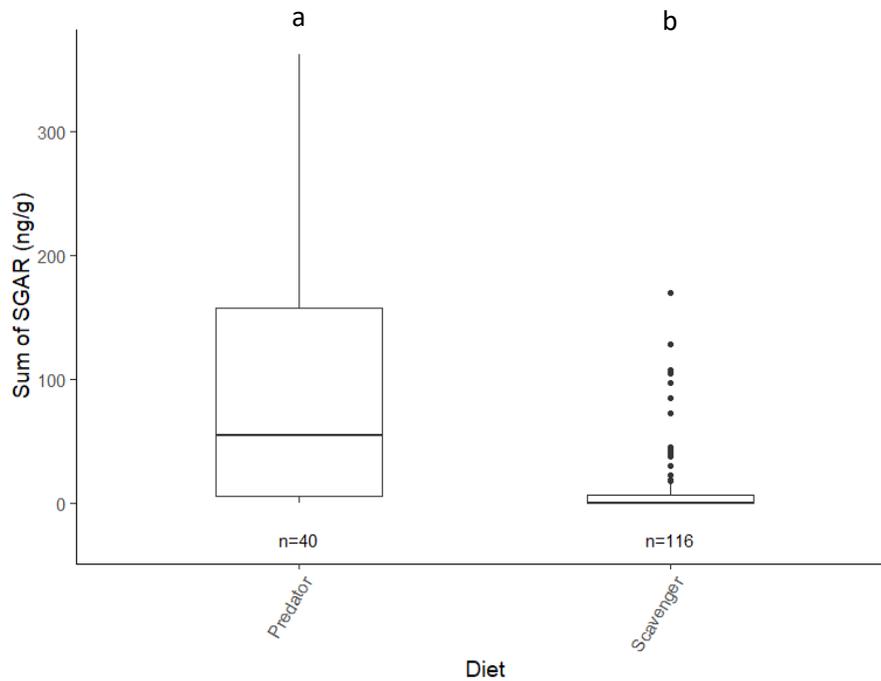


Figure 3: A/ Summed SGAR concentrations per bird species (boxplot) and B/ summed SGAR concentration by foraging behaviour (boxplot); individual SGARs<LOQ were assigned a value of zero. Species or foraging behaviour groups not sharing a common lower case are different ($p < 0.05$). SGAR, second-generation anticoagulant rodenticide; LOQ, limit of quantification.

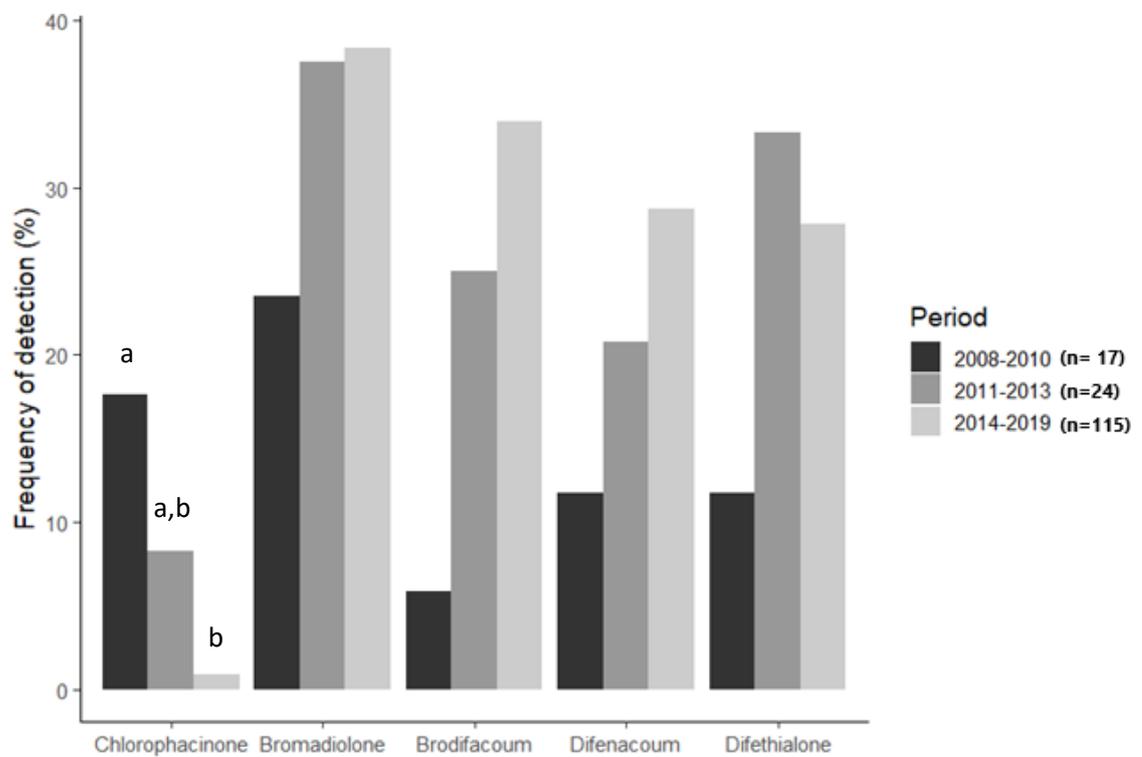


Figure 4: Detection frequency of each AR per time period; chlorophacinone detection frequency differed ($p < 0.05$) between 2008-2010 and 2014-2019 as indicated by different letters superscripts.

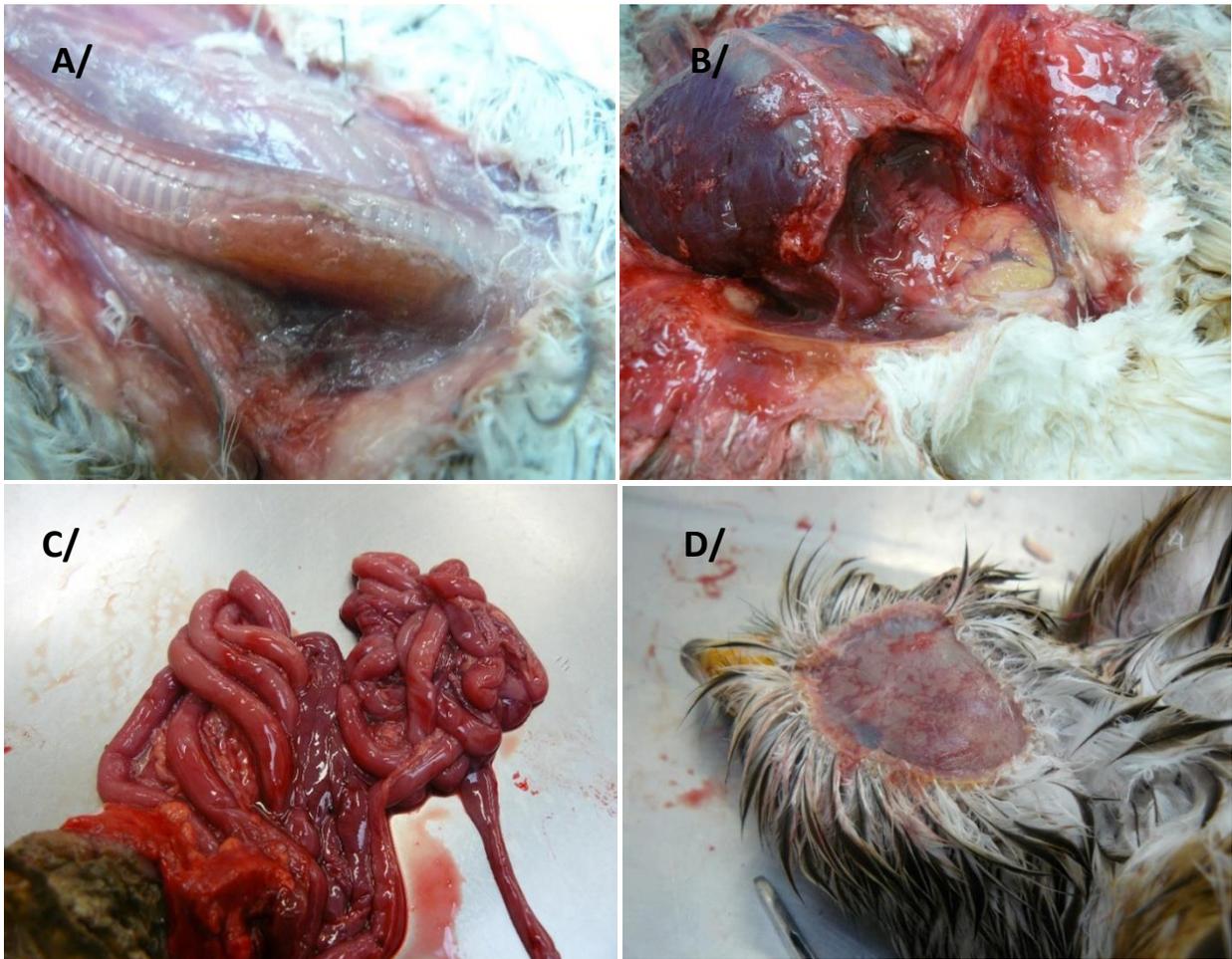


Figure 5: Haemorrhagic lesions in bird n°3. A: Cervical haematoma, surrounding the trachea - B: Blood in coelomic cavity - C: Haemorrhage of digestive tract- D: Haematoma on the surface of the skull

Tables

Table 1: Species, sample size, foraging behaviour and frequency of exposure to ARs of raptors collected between 2008-2019 ¹

Feeding habit	Species	n	AR exposed	N exposed					
				CHLORO	BROMA	BFC	DFC	DFT	Multiple ARs
			(%)	(% of tested samples N) (% of AR exposed)					
SCAVENGERS	Griffon vulture (<i>Gyps fulvus</i>)	90	29/90 (32)	3 (3) (10)	17 (19) (59)	10 (11) (34)	10 (11) (34)	13 (14) (45)	13 (14) (45)
	Cinereous vulture (<i>Aegypius monachus</i>)	17	13/17 (76)	2 (12) (15)	10 (59) (77)	5 (29) (38)	6 (35) (46)	6 (35) (46)	7 (41) (54)
	Bearded vulture (<i>Gypaetus barbatus</i>)	9	3/9 (33)	0	2 (22) (67)	1 (11) (33)	2 (22) (67)	2 (22) (67)	2 (22) (66)
PREDATORS	Bonelli's eagle (<i>Aquila fasciata</i>)	7	5/7 (71)	0	4 (57) (80)	4 (57) (80)	5 (71) (100)	4 (57) (80)	4 (57) (80)
	Red kite (<i>Milvus milvus</i>)	16	16/16 (100)	0	14 (87) (87)	15 (94) (94)	9 (56) (56)	7 (44) (44)	14 (87) (87)
	Golden eagle (<i>Aquila chrysaetos</i>)	7	7/7 (100)	0	6 (86) (86)	7 (100) (100)	6 (86) (86)	7 (100) (100)	7 (100) (100)
	Common buzzard (<i>Buteo buteo</i>)	3	1/3	0	1	1	1	1	1

Black kite (<i>Milvus migrans</i>)	1	1/1	0	0	1	0	0	0
Eurasian eagle-owl (<i>Bubo bubo</i>)	2	2/2	1	2	2	2	2	2
Hen harrier (<i>Circus cyaneus</i>)	2	0/2	0	0	0	0	0	0
Eurasian hobby (<i>Falco subbuteo</i>)	1	0/1	0	0	0	0	0	0
Short-toed snake eagle (<i>Circaetus gallicus</i>)	1	1/1	0	1	0	0	0	0
TOTAL	156	78/156	6	57	46	41	42	50
		50	(4) (8)	(37) (73)	(29) (59)	(26) (53)	(27) (54)	(32) (64)

¹ % were reported when sample size was greater than 5; abbreviations: chlorophacinone, CHLORO; bromadiolone, BROMA; brodifacoum, BFC; difenacoum, DFC; difethialone, DFT; not analyzed, NA.

Table 2: Hepatic residues of anticoagulant rodenticides (in ng/g ww or *pmol/g ww*) in raptors collected in France between 2008-2019

Feeding habit	Species	CHLORO	BROMA	BFC	DFC	DFT	ΣSGARs
		Kaplan-Meier mean (in ng/g ww)					
		Kaplan-Meier mean (in pmol/g ww)					
	N	Range (ng and pmol/g ww)					
		Detects >LOQ					
				-			>100 ng.g-1/detects
SCAVENGERS	Griffon vulture	0.4-2.3	2.92-4.50	2.6-4.3	0.7-2.4	0.7-2.4	6.9-13.6
	<i>(Gyps fulvus)</i>	<i>0.9-6.0</i>	<i>5.5-8.5</i>	<i>4.9-8.2</i>	<i>1.5-5.5</i>	<i>13.1-44.5</i>	<i>13.3-26.67</i>
	90	LOQ-16.3/ <i>43.5</i>	LOQ-86.0/ <i>163.1</i>	LOQ- 63.5/ <i>121.3</i>	LOQ-11.1/ <i>25.0</i>	LOQ-10.9/ <i>20.2</i>	LOQ-128.0/ <i>246.2</i>
		3/90	17/90	10/90	10/90	13/90	29/90
							2/29
	Cinereous vulture	0.7-2.5	11.94-12.64	5.0-6.2	5.4-6.7	8.4-9.7	30.8-35.3
	<i>(Aegypius monachus)</i>	<i>2.0-6.6</i>	<i>22.6-24.0</i>	<i>9.5-11.9</i>	<i>12.2-15.1</i>	<i>15.6-18.0</i>	<i>59.9-69.0</i>
	17	LOQ-9.1/ <i>24.3</i>	LOQ-61.0/ <i>115.7</i>	LOQ-39.3/ <i>75.1</i>	LOQ-54.6/ <i>122.8</i>	LOQ-71.4/ <i>132.3</i>	LOQ-169.6/ <i>338.12</i>
		2/17	10/17	5/17	6/17	6/17	13/17
							2/13
Bearded vulture	/	2.4 -3.9	2.2-4.0	1.7-3.2	3.8-5.4	10.1-16.5	
<i>(Gypaetus barbatus)</i>	<i>/</i>	<i>4.5-7.4</i>	<i>4.3-7.6</i>	<i>3.8-7.3</i>	<i>7.1-10.0</i>	<i>19.7-32.3</i>	
9	LOQ	LOQ-11.9/ <i>22.56</i>	LOQ-19.9/ <i>38.0</i>	LOQ-11.2/ <i>25.2</i>	LOQ-27.7/ <i>51.3</i>	LOQ-42.2/ <i>81.4</i>	
	0/9	2/9	1/9	2/9	2/9	3/9	
						0/3	
PREDATORS	Red kite	/	29.1-29.4	37.5-37.6	20.2-21.0	20.0-21.0	106.8-108.9
	<i>(Milvus milvus)</i>	<i>/</i>	<i>55.2-55.7</i>	<i>71.6-71.9</i>	<i>45.5-47.1</i>	<i>37.1-38.9</i>	<i>209.4-213.6</i>
	16	LOQ	LOQ-121.9/ <i>231.1</i>	LOQ-231.4/ <i>442.1</i>	LOQ-95.3/ <i>214.4</i>	LOQ-122.3/ <i>226.7</i>	2.4/ <i>4.2-365.3/705.4</i>
		0/16	14/16	15/16	9/16	7/16	16/16

							7/16
Bonelli's eagle (<i>Aquila fasciata</i>)	/	14.1-15.0	12.8-13.4	17.1-17.7	10.9-11.7	54.9-57.7	
	/	26.8-28.40	24.5-25.6	38.5-39.8	20.1-21.7	109.9-115.4	
7	LOQ	LOQ-35.4/67.1	LOQ-71.0/135.6	LOQ-88.0/198.0	LOQ-35.2/65.2	LOQ-224.0/455.5	
	0/7	4/7	4/7	5/7	4/7	5/7	1/5
Golden eagle (<i>Aquila chrysaetos</i>)	/	32.7-32.9	53.1-53.1	24.2-24.5	19.5-19.5	129.4-130.0	
	/	61.9-62.5	101.4-101.4	54.5-55.1	36.1-36.1	253.9-255.1	
7	LOQ	LOQ-112.0/212.4	3.1/5.9-98.0/187.2	LOQ-63.0/141.7	5.3/9.8-33.0/61.2	21.3/36.3-204.4/410.0	
	0/7	6/7	7/7	6/7	7/7	7/7	6/7
Common buzzard (<i>Buteo buteo</i>)	/	2.6-3.9	20.8-22.1	5.9-7.2	49.8-51.1	79.1-84.3	
	/	4.9-7.4	39.7-42.2	13.2-16.2	92.3-94.8	150.2-160.6	
3	LOQ	LOQ-7.7/14.6	LOQ-62.3/119.0	LOQ-17.6/39.6	LOQ-149.4/276.9	LOQ-237.0/450.1	
	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/1
Hen harrier (<i>Circus cyaneus</i>)	/	/	/	/	/	/	
	/	/	/	/	/	/	
2	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	
	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/0
Eurasian eagle-owl (<i>Bubo bubo</i>)	1.8-2.8	88.4-88.4	44.4-44.4	46.5-46.5	73.8-73.8	253.0-253.0	
	4.7-7.3	167.6-167.6	84.7-84.7	104.5-104.5	136.8-136.8	493.6-493.6	
2	LOQ-3.5/9.3	71.6/135.8-105.2/199.5	13.9/26.6-74.8/142.9	30.7/69.1-62.2/139.9	30.2/56.0-117.4/217.6	180.0/351.1-326.0/636.2	
	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

Black kite	/	/	/	/	/	/	/
<i>(Milvus migrans)</i>	/	/	/	/	/	/	/
1	LOQ	LOQ	3.0/5.7	LOQ	LOQ	LOQ	3.0/5.7
	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1
							0/1
Short-toed snake eagle	/	44.0	/	/	/	/	/
<i>(Circaetus gallicus)</i>	/	83.4	/	/	/	/	/
1	LOQ	44.0/83.4	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	44.0/83.4
	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1
							0/1
Eurasian hobby	/	/	/	/	/	/	/
<i>(Falco subbuteo)</i>	/	/	/	/	/	/	/
1	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
							0/0

Abbreviations: chlorophacinone, CHLORO; bromadiolone, BROMA; brodifacoum, BFC; difenacoum, DFC; difethialone, DFT; limit of quantification, LOQ.

Table 3: Levels of ARs, haemorrhagic lesions and presence of blood clots in individuals suspected of AR toxicosis

Bird	Species	Year	CHLORO	BROMA	BFC	DFC	DFT	Σ SGARs	Macroscopic haemorrhagic lesions at necropsy	Blood clots in cardiac cavity (Y/N/NA)
					(ng/g ww)					
1	Red kite	2013	0	31.6	2.1	0	0	33.7	Subcutaneous hematoma of the thoracic area Serohaemorrhagic pericardial effusion	Y
2	Red kite	2018	0	2.1	25.2	0	0	27.3	Haemorrhage of the right eye Slight bleeding of lung surface	Y
3	Red kite	2018	0	52.5	8	63.2	68.2	191.9	Hematoma of right pectoral muscle and neck Blood in abdominal cavity Lung haemorrhage Haemorrhage of digestive tract Several hematoma on the surface of the skull bone	N
4	Red kite	2019	0	4.4	86	0	5.8	96.2	Subcutaneous hematoma of the thoracic area Lung haemorrhage Haemorrhage of pericardium	N

Abbreviations: chlorophacinone, CHLORO; bromadiolone, BROMA; brodifacoum, BFC; difenacoum, DFC; difethialone, DFT; second-generation anticoagulant rodenticide, SGAR.

Table S1 –Surveillance programmes implicated in the study, and number of birds provided by each program.

Name of the project	Number of birds provided for the study
LIFE GYPCONNECT (https://gypaetebarbu.fr/life-gypconnect/)	118
VIGILANCE POISON (Berny et al. 2015)	47
PNA Cinereous Vulture (https://www.ecologie.gouv.fr/sites/default/files/PNA_Vautour-moine_2011-2016.pdf (2nd PNA))	34
PNA Red Kite (https://www.ecologie.gouv.fr/sites/default/files/PNA-Milan-Royal-2018-2027.pdf)	30
LIFE GYPHELP (https://gypaete-barbu.com/10/le-projet-life-gyphelp/58/pourquoi-ce-projet.html)	9
Unknown project	7
TOTAL	245

Table S2 - Outlier SGAR levels in scavengers. Individual SGARs \leq LOQ were assigned a value of zero.

Species	BROMA	BFC	DFC	DFT	Σ SGARs
	(ng/g ww)				(ng/g ww)
Cinereous vulture (<i>Aegypius monachus</i>)	61	39.3	6.7	0	107
Cinereous vulture (<i>Aegypius monachus</i>)	24.2	19.4	54.6	71.4	169.6
Griffon vulture (<i>Gyps fulvus</i>)	86	22.6	10.1	9.3	128
Griffon vulture (<i>Gyps fulvus</i>)	53	45.6	2.6	3.4	104.6

Abbreviations: chlorophacinone, CHLORO; bromadiolone, BROMA; brodifacoum, BFC; difenacoum, DFC; difethialone, DFT.

IV.3. Etude préliminaire de la vitamine K comme marqueur candidat des intoxications aux AVK

IV.3.1. Objectifs

Cette 3^{ème} étude constitue un travail préliminaire dans l'investigation du potentiel de la vitamine K comme biomarqueur d'effet de la toxicité des rodenticides anticoagulants. Elle se décline autour de deux volets, réalisés dans des conditions expérimentales sur rats de laboratoire :

- Un premier volet (étude A) s'intéressant à l'impact de la supplémentation en vitamine K (sous forme de vitamine K1 et K3) sur les taux basaux des différents vitamères et les ratios entre les formes époxydes et les formes quinones, dans le foie, en conditions physiologiques, afin de tenter de répondre à une première interrogation : est-ce que ces paramètres sont sensibles aux variations d'apport, qu'ils soient nutritionnels ou thérapeutiques ? En effet, dans le milieu naturel, un apport alimentaire en vitamine K1 est possible, mais ce vitamère constitue surtout l'antidote de choix pour les intoxications aux AVK, et il est intéressant de savoir si le dosage de la vitamine K pourrait être utilisé même après administration de l'antidote. Cela est d'autant plus intéressant dans ce cadre préliminaire qu'une supplémentation en vitamine K1 sera nécessaire pour maintenir les rats de laboratoire en vie suffisamment longtemps pour suivre l'évolution dans le temps des vitamères suite à une intoxication volontaire à un AVK (dans cette étude, la bromadiolone). La vitamine K3 quant à elle constitue une supplémentation synthétique fréquente de la nourriture de rats de laboratoire, aussi est-il important d'évaluer l'impact de cette supplémentation avant toute investigation expérimentale supplémentaire de ce marqueur.
- Un second volet (étude B) visant à déterminer chez le rat l'évolution des concentrations en vitamères de la vitamine K dans différents organes suite à une intoxication volontaire à la bromadiolone : ce volet est une première étape pour évaluer la pertinence du dosage des vitamères de la vitamine K dans le cadre d'intoxications aux AVK.

L'étude n'a pas été soumise à une revue scientifique, aussi sera-t-elle présentée dans son intégralité ici, avec une discussion portée sur les résultats obtenus, qui seront également repris dans la discussion générale de la thèse.

IV.3.2. Méthodes

IV.3.2.1. Dosage de la vitamine K chez le rat de laboratoire dans différentes conditions d'étude

Les études sur les rats ont été menées selon des protocoles expérimentaux examinés et approuvés par le gouvernement français en vertu de la directive 2010/63/EU relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. et avec l'accord du comité d'éthique de VetAgro Sup. L'environnement, le logement et la gestion des rats étaient conformes au bien-être des animaux.

IV.3.2.1.1. Etude A : effet de la supplémentation en vitamine K1 et vitamine K3 sur les teneurs en vitamines K dans le foie

IV.3.2.1.1.1. Population d'étude, protocoles expérimentaux

L'étude porte sur 4 groupes de 4 rats mâles de la souche OFA-Sprague Dawley, âgés de 6 semaines, acclimatés pendant 1 semaine. Chaque groupe est hébergé dans une cage de type T4 (Techniplast), mesurant 598x380x200mm, avec une litière SAFE BK8/15 à base d'éclats de bois de hêtre, et pour l'enrichissement deux tubes en PVC et des bâtonnets de bois. Les groupes expérimentaux sont constitués comme suit :

- *Groupe « Non supp »* : ce groupe reçoit uniquement une alimentation « SAFE-A04 », un aliment d'entretien avec une teneur en vitamine K3 de 2,5mg/kg d'aliment, distribuée ad libitum. En assumant une consommation journalière d'aliment d'environ 10 g pour 100 g de poids vif de rat, cela revient à une supplémentation par voie orale à hauteur d'environ 0,25 mg/kg de poids vif/jour.
- *Groupe « K3 »* : ce groupe reçoit l'alimentation SAFE-A04, ainsi qu'une complémentation en vitamine K3 (dérivé hydrosoluble) dans l'eau de boisson à raison de 200mg/L. Si on estime la consommation journalière en eau d'un individu à hauteur de 10mL pour 100 g de poids vif, la supplémentation via l'eau de boisson correspond environ à une dose de 20 mg/kg poids vif/jour, soit une complémentation en vitamine K3 près de 100 fois supérieure à celle du groupe « Non supp ».

- *Groupe « K1 »*: en plus de l'alimentation SAFE-A04, les individus reçoivent une complémentation en vitamine K1 par injection sous-cutanée (SC), à raison de 300µg/rat (soit 0.03mL/rat – environ 1mg/kg).
- *Groupe « K1K3 »*: ce groupe reçoit l'alimentation SAFE-A04 ainsi qu'une supplémentation en vitamines K1 et K3, aux mêmes doses que pour les groupes K1 et K3.

Les rats sont euthanasiés au bout d'une semaine à l'aide d'une chambre d'inhalation au CO₂. Le foie, les reins, les testicules, le cœur, les poumons, le pancréas, l'aorte et le cerveau sont prélevés pour chaque individu. Les organes ainsi récupérés sont pesés avec une balance de précision (Sartorius), et stockés au congélateur à -20°C. Pour cette étude, seuls les prélèvements de foie sont exploités.

IV.3.2.1.1.2. Dosages des vitamines de la vitamine K

Les vitamines dosées sont les vitamines K1 et ménaquinone-4 (MK4), et leurs formes oxydées (respectivement notées K1ox et MK4ox), par une HPLC couplée à une réduction post-colonne au zinc et une détection fluorométrique.

Pour chaque individu, un prélèvement de 0.5 +/- 0.05 g de foie est disposé dans un tube sec, dans lequel sont ajoutés 2mL d'eau milliQ et 4mL d'éthanol. Le tout est mouliné à l'ultra-turrax pendant 30sec. Pour l'extraction des vitamines, 4mL d'hexane sont ajoutés. Après passage au vortex les échantillons sont centrifugés à 3000 rpm pendant 5min à 4°C. Le surnageant est conservé dans un autre tube (n°2), et une nouvelle extraction à l'hexane (4mL) est réalisée dans le tube n°1, suivie d'une centrifugation : le surnageant est ajouté au tube n°2. L'hexane est ensuite évaporé à sec sous un flux d'air, à 37°C. L'extrait sec est repris dans 500µL de méthanol, et 20µL sont injectés dans le système HPLC.

La séparation chromatographique est réalisée sur un système HPLC composé d'une colonne C18 endcapped (5µm, 4mm, 25cm), associée à une post-colonne (2,1mm, 5cm) remplie manuellement de poudre de zinc (99%), selon un gradient d'élution. La colonne est couplée à un système de détection fluorométrique. La limite de quantification (LOQ) est fixée à 5 ng/g.

IV.3.2.1.2. Etude B : évolution des différents vitamines de la vitamine K dans le foie, le rein et le poumon, après administration d'une dose létale de bromadiolone

IV.3.2.1.2.1. Population d'étude, protocole expérimental

Seize (16) rats mâles de souche OFA-Sprague Dawley (Charles River), âgés de 6 semaines, sont répartis en 4 lots de 4 rats par cage de type T4 (Techniplast), mesurant 598x380x200mm, avec une litière SAFE BK8/15 à base d'éclats de bois de hêtre, et pour l'enrichissement deux tubes en PVC et des bâtonnets de bois. Ils reçoivent une nourriture en granules SAFE A04, identique à celle de l'étude A, donnée ad libitum. Les rats sont acclimatés pendant 7 jours avant le début de l'étude.

A J0, une administration de bromadiolone est réalisée par gavage, à raison de 4 fois la dose médiane efficace (DE50 - dose qui permet d'augmenter chez 50% des animaux le temps de coagulation par un facteur 5 dans les 24h suivant l'administration) (Rodenticide resistance Action Committee of CropLife International (RRAC), 2003), soit 2 mg/kg.

Les rats reçoivent une supplémentation journalière en vitamine K1, à raison de 0,1mg/kg SC (soit une dose 10 fois inférieure à celle testée dans l'étude A, pour éviter la saturation du système d'analyse). Cette supplémentation vise à compenser la carence alimentaire (aliment standard supplémenté en vitamine K3 mais ne permettant pas d'apporter de vitamine K1), et ainsi à éviter une mort trop rapide des individus intoxiqués. Elle est débutée 3 jours avant l'intoxication volontaire à la bromadiolone et est continuée tout au long de l'étude excepté le jour de leur mise à mort.

Un suivi clinique quotidien des animaux est réalisé.

Les euthanasies sont effectuées par groupe de 4 animaux à J0 (groupe témoin, non intoxiqué à la bromadiolone), J1, J3 et J4 post-intoxication, par injection intra-cardiaque d'une dose létale de pentobarbital (Doléthal[®]), après anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Une brève autopsie des rats, avec consignation des lésions éventuelles (notamment la présence d'hémorragies) est réalisée, et pour chaque individu sont récupérés le foie, les testicules, les reins, le cœur, les poumons, l'aorte et le cerveau. Les organes ainsi récupérés sont pesés avec une balance de précision (Sartorius). Pour cette étude, seuls les échantillons de foie, de reins et de poumons sont utilisés.

IV.3.2.1.2.2. Dosages des vitamines de la vitamine K

Les dosages des vitamines K1, K1ox, MK4 et MK4ox sont réalisés sur le foie, le rein et le poumon, selon le protocole décrit dans l'étude A.

IV.3.2.1.2.3 Dosage de la bromadiolone dans les organes étudiés

La bromadiolone est quantifiée en parallèle dans le foie, le rein et le poumon. Pour cela, 1g d'organe est prélevé, auquel on ajoute 100 µL d'un étalon interne, la warfarine, concentrée à 200 µg/mL dans le méthanol. L'extraction se réalise par l'ajout à 2 reprises de 10 mL d'acétone. Un broyage est réalisé à l'ultra-turrax, puis l'échantillon est centrifugé 5min à 3000 tours/min. Le surnageant est récupéré, évaporé à sec à 60°C, puis repris dans 2mL de méthanol. Cette étape est suivie d'une nouvelle évaporation à sec et d'une reprise dans 200 µL de méthanol, auxquels sont ajoutés 2mL d'acétonitrile et 2mL d'hexane. L'échantillon est vortexé, centrifugé à 3000 tours/min pendant 5min. La phase hexanique est alors éliminée. Cette élimination est suivie d'une dernière évaporation à sec, et d'une reprise dans 1mL de méthanol.

Le dosage est réalisé par HPLC sur une colonne C18 Lichrospher Endcapped VWr (250 x 4,6 – 5µm), avec une phase mobile méthanol/eau H₃PO₄ 0.2%. La détection se fait à 265 nm. Vingt (20) µL sont injectés dans le système.

IV.3.2.2. Statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R version 3.5.1 associé à RStudio version 1.1.453. Pour l'étude A, la différence entre les concentrations des vitamines (MK4, MK4ox, K1, K1ox) selon la supplémentation a été testée par la mise en place d'une ANOVA à un facteur suivie d'une comparaison 2 à 2 des moyennes (Tukey). Le même test statistique a été employé dans l'étude B pour détecter les différences dans les concentrations des vitamines selon le jour post-intoxication à la bromadiolone.

IV.3.3. Résultats

IV.3.3.1. Effet de la supplémentation en vitamine K1 et vitamine K3 sur les teneurs en vitamines K dans le foie

Le Tableau 7 présente les résultats de l'étude A : dans ce tableau, les valeurs nulles sont conservées, et les concentrations détectées mais non quantifiables (<LOQ) ont été remplacées par la valeur de la LOQ (5 ng/g MF).

Tableau 7 : concentrations hépatiques en MK4, K1 et leurs formes oxydées selon la supplémentation (en ng/g MF) en vitamine K. Le groupe non supplémenté correspond à un groupe d'animaux n'ayant pas reçu de supplémentation en vitamine K hormis celle reçue via son alimentation. Le groupe K1 a reçu une supplémentation en vitamine K1 pour voie sous-cutanée ; le groupe K3 a reçu une supplémentation en vitamine K3 par voie orale (eau de boisson) ; le groupe K1K3 a reçu les deux supplémentations.

Groupe	MK4ox (ng/g)		MK4 (ng/g)		K1ox (ng/g)		K1 (ng/g)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Non supp	5,00	0,00	23,33	2,81	5,00	0,00	5,00	0,00
K1	18,71	1,66	31,04	16,68	7,38	1,17	1179,38	108,75
K1K3	14,84	4,03	23,52	6,05	5,84	1,68	1007,00	98,92
K3	5,00	0,00	24,90	6,07	5,00	0,00	5,00	0,00

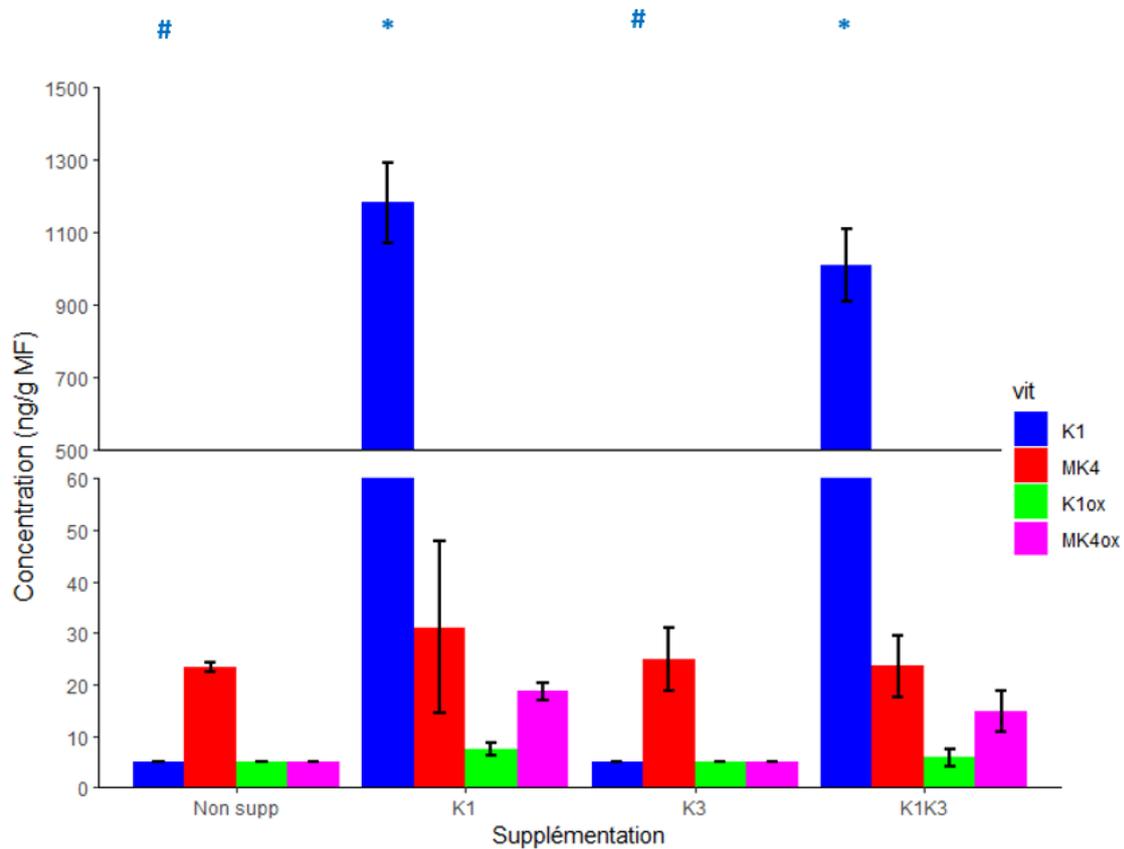


Figure 17 : Concentrations hépatiques en MK4, K1 et leurs formes oxydées selon la supplémentation en vitamine K. Le groupe non supplémenté correspond à un groupe d'animaux n'ayant pas reçu de supplémentation en vitamine K hormis celle reçue via son alimentation. Le groupe K1 a reçu une supplémentation en vitamine K1 par voie sous-cutanée ; le groupe K3 a reçu une supplémentation en vitamine K3 par voie orale (eau de boisson) ; le groupe K1K3 a reçu les deux supplémentations.

Pour les concentrations en vitamine K1, les groupes ne partageant pas un symbole commun sont significativement différents ($p < 0.0001$).

Quelle que soit la supplémentation, les concentrations des formes oxydées K1ox et MK4ox et de la MK4 réduite varient peu (Figure 17), et ne sont statistiquement pas différentes (ANOVA, p -value > 0.9). De plus, pour tous les groupes, les formes oxydées MK4ox et K1 sont présentes à des concentrations très faibles, de l'ordre de la LOQ ou légèrement au-dessus. On note tout de même une légère augmentation de MK4ox, non significative, en présence d'un apport en vitamine K1 (groupes K1 et K1K3).

La concentration en K1 est quant à elle significativement supérieure dans les groupes recevant une supplémentation en vitamine K1 (groupes K1 et K1K3) ($p < 0.0001$), le système est saturé. Les groupes non supplémentés en vitamine K1 présentent des concentrations < LOQ.

IV.3.3.2. Evolution des différents vitamères de la vitamine K dans le foie, le rein et le poumon, après administration d'une dose létale de bromadiolone

Comme pour l'étude A, les concentrations en vitamères détectées mais non quantifiées (<LOQ) ont été assimilées à la LOQ (5 ng/g MF).

IV.3.3.2.1. Suivi clinique des rats

A J1 et J2, aucune anomalie n'est détectée ; à J3, un manque de toilettage est décelé chez 2 individus (2/8).

En revanche à J4, tous les individus observés présentent des signes cliniques : pelage rêche (4/4), pâleur (4/4), abdomen dur (2/4), perte de poids (2/4), manque de toilettage (1/4), position recroquevillée (1/4). En outre 2 individus présentent des signes de saignements, et chez l'un d'entre eux on note une respiration accélérée, des tremblements, et des vocalises à la manipulation. En *post-mortem* des hémorragies sont notées chez 3 individus sur 4, dont un est mort spontanément dans la nuit de J3 à J4.

IV.3.3.2.2. Evolution des concentrations en vitamères dans le foie

Le Tableau 8 et la Figure 18 présentent l'évolution dans le foie des vitamères sous forme oxydée et réduite au cours du temps. K1ox est détectée seulement à partir de J1 post-intoxication, à un taux moyen de 7,7 ng/g MF (+/- 1,9), et semble augmenter par la suite, de manière non significative (ANOVA à double facteur, $p > 0.5$). On note également une diminution significative de K1 et MK4 entre J0 et J1 ($p < 0.0001$), d'un facteur 4 environ pour K1 et 2,5 pour MK4. Leurs concentrations restent relativement stables par la suite. MK4ox semble également augmenter, mais de manière non significative (seule différence significative entre les concentrations moyennes à J0 et J4).

Tableau 8: Concentrations dans le foie (en ng/g MF) des différents vitamères de la vitamine K, en fonction du jour d'intoxication à la bromadiolone. Le prélèvement à J0 a été fait juste avant l'administration orale de bromadiolone. Les J1, J3 et J4 correspondent aux prélèvements effectués 1, 3 et 4 jours après l'administration de bromadiolone.

	MK4ox (ng/g)		MK4 (ng/g)		K1ox (ng/g)		K1 (ng/g)	
	Moyenne	<i>Ecart-type</i>	Moyenne	<i>Ecart-type</i>	Moyenne	<i>Ecart-type</i>	Moyenne	<i>Ecart-type</i>
J0	5,5	1,0	19,1	3,8	ND	/	37,0	6,8
J1	8,8	0,8	6,9	0,9	7,7	1,9	9,3	0,7
J3	9,2	1,4	6,9	0,8	7,3	2,9	6,5	1,5
J4	12,7	3,9	5,6	0,7	11,0	10,4	6,5	1,3
ND :				Non				déecté

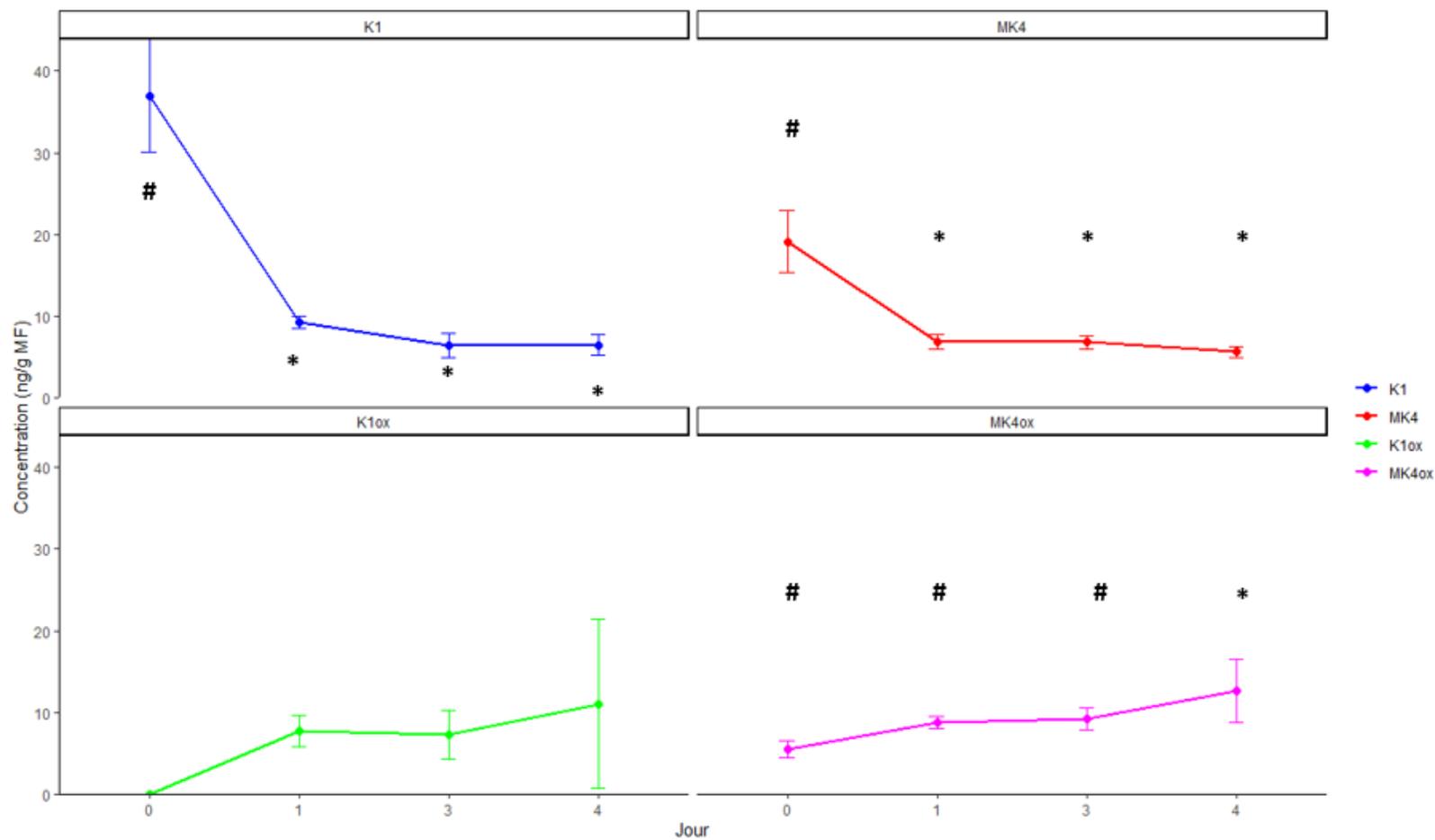


Figure 18: Evolution des concentrations hépatiques des différents vitamines (en ng/g) en fonction du jour post intoxication volontaire à la bromadiolone. Pour chaque vitamine, les concentrations avec des symboles différents sont significativement différentes ($p < 0,001$)

IV.3.3.2.3. Evolution des vitamines dans le poumon

Le Tableau 9 et la Figure 19 présentent l'évolution dans le poumon des vitamines sous forme oxydée et réduite au cours du temps.

Tableau 9 : Concentrations dans le poumon (en ng/g MF) des différents vitamines de la vitamine K, en fonction du jour d'intoxication à la bromadiolone. Le prélèvement à J0 a été fait juste avant l'administration orale de bromadiolone. Les J1, J3 et J4 correspondent aux prélèvements effectués 1, 3 et 4 jours après l'administration de bromadiolone.

	MK4ox (ng/g)		MK4 (ng/g)		K1ox (ng/g)		K1 (ng/g)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
J0	15,2	6,8	38,6	7,5	5,0	0,0	19,6	9,1
J1	16,4	3,8	7,6	2,4	5,0	0,0	5,9	1,9
J3	26,8	15,1	5,0	0,0	6,2	2,4	5,0	0,0
J4	26,8	11,7	5,9	1,6	15,1	8,0	7,8	4,7

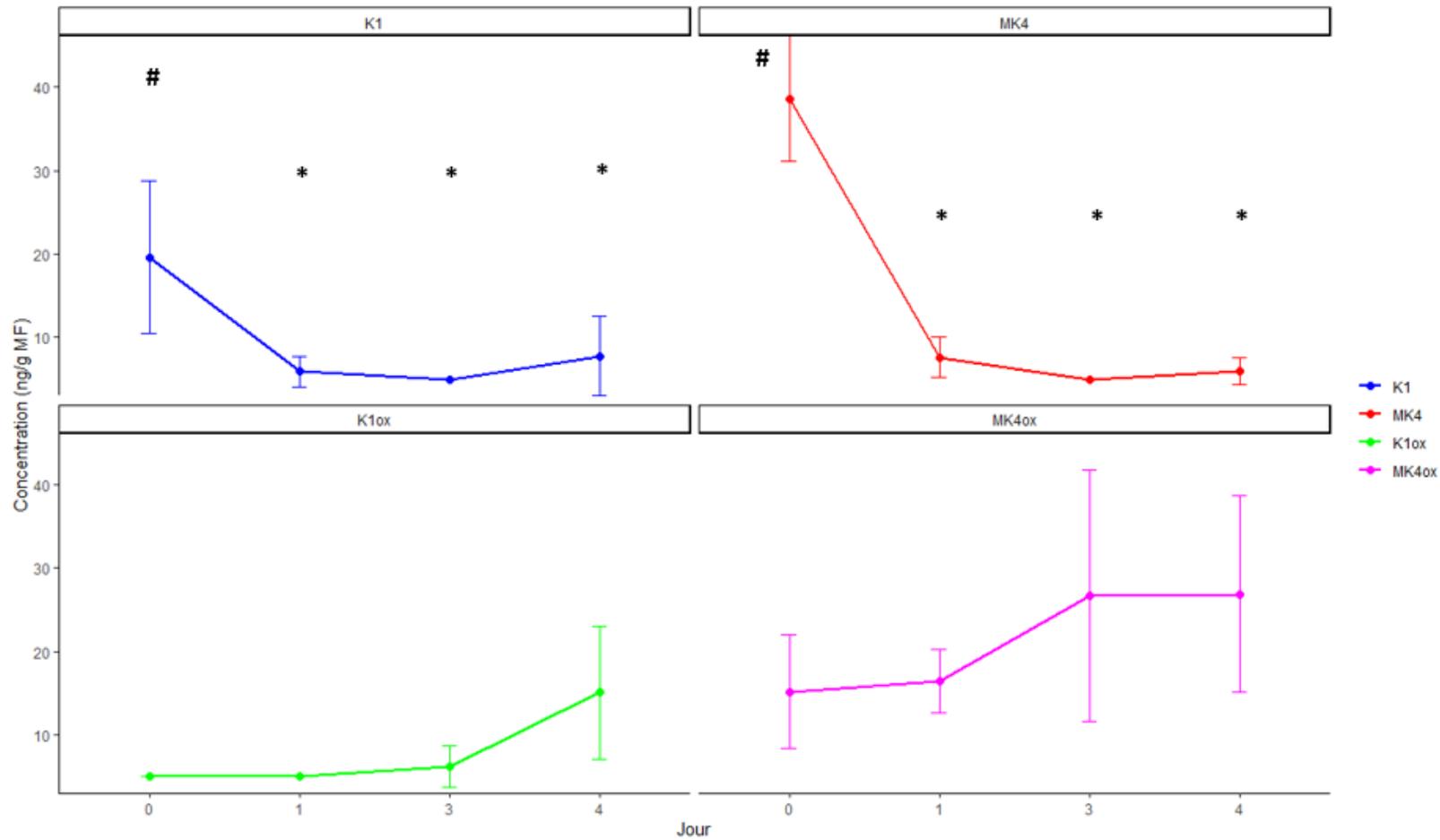


Figure 19 : Evolution des concentrations pulmonaires des différents vitamères (en ng/g) en fonction du jour post intoxication volontaire à la bromadiolone. Pour chaque vitamère, les concentrations avec des symboles différents sont significativement différentes ($p < 0,001$ pour MK4, $p < 0,002$ pour K1).

On observe également dans le poumon une baisse significative de MK4 et K1 entre J0 et J1 (ANOVA double facteur, pour MK4 $p < 0,0001$, pour K1 $p < 0,002$), d'un facteur 5 environ pour MK4 et 3 pour K1. En revanche il n'y a pas de différence significative entre les jours pour les formes oxydées ($p > 0,5$).

IV.3.3.2.4. Evolution des vitamines dans le rein

Le Tableau 10 et la Figure 20 présentent l'évolution dans le rein des vitamines sous forme oxydée et réduite au cours du temps.

Tableau 10 : Concentrations dans le rein (en ng/g MF) des différents vitamines de la vitamine K, en fonction du jour d'intoxication à la bromadiolone. Le prélèvement à J0 a été fait juste avant l'administration orale de bromadiolone. Les J1, J3 et J4 correspondent aux prélèvements effectués 1, 3 et 4 jours après l'administration de bromadiolone.

	MK4ox (ng/g)		MK4 (ng/g)		K1ox (ng/g)		K1 (ng/g)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
J0	6,3	2,3	88,9	54,9	ND	/	5,8	1,3
J1	18,0	10,2	12,1	3,7	5,0	0,0	5,0	0,0
J3	11,6	5,4	14,3	3,6	5,0	0,0	5,0	0,0
J4	19,4	2,5	5,6	1,1	5,0	0,0	5,0	0,0
ND :				Non				déecté

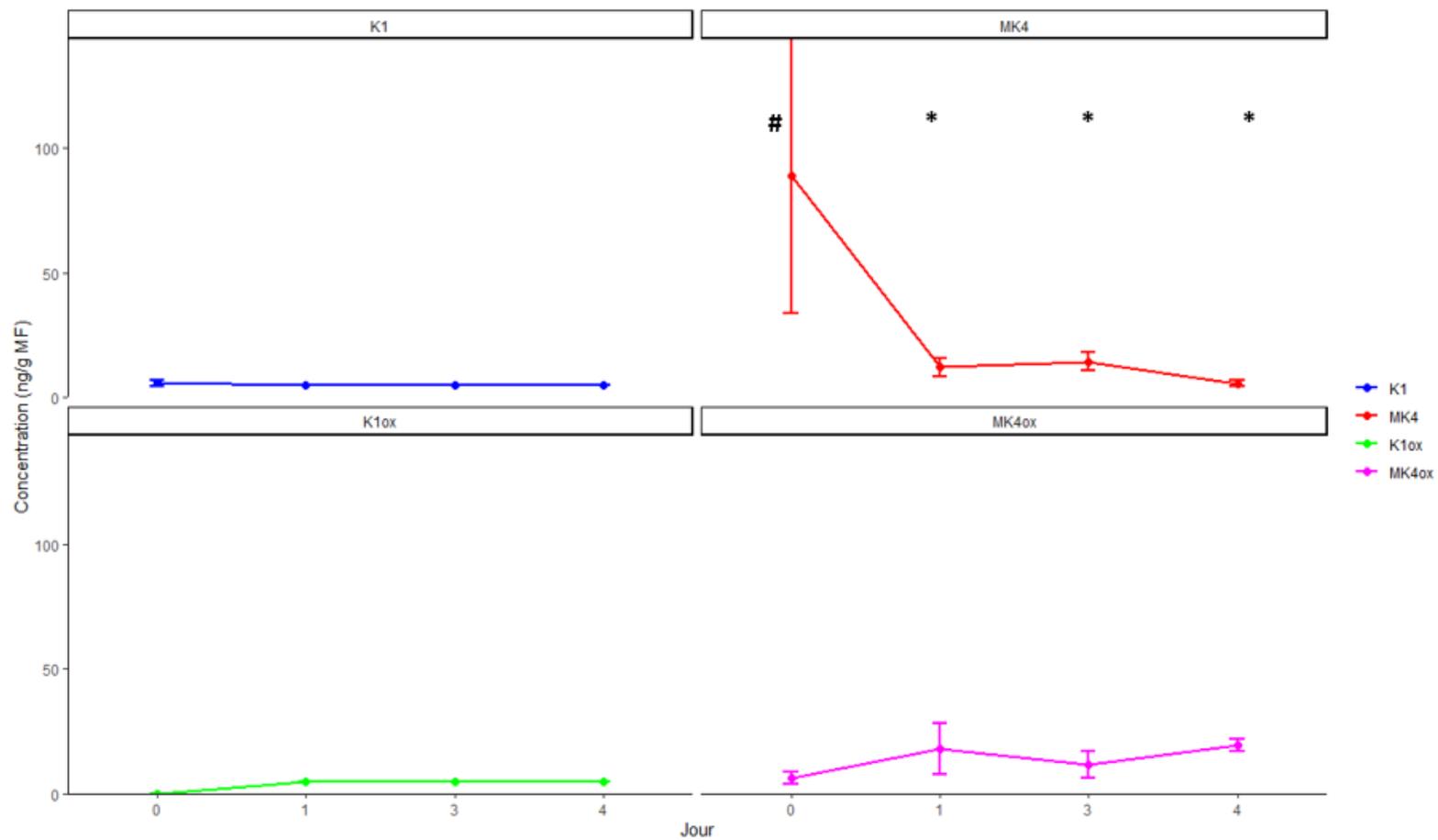


Figure 20 : Evolution des concentrations rénales des différents vitamères (en ng/g) en fonction du jour post intoxication volontaire à la bromadiolone. *Pour chaque vitamère, les concentrations avec des symboles différents sont significativement différentes (p<0,001).*

On note dans le rein une forte concentration basale (J0) de MK4 par rapport au foie et au poumon, avec une concentration moyenne de 88,9 ng/g MF (+/- 54,9), alors que la concentration en vitamine K1 est proche de la LOQ. La forme oxydée de la vitamine K1 est également détectée à des valeurs inférieures à la LOQ fixée, tandis que MK4ox est quantifié dès J0 et augmente de manière non significative. La seule variation significative dans les vitamines suite à l'administration de bromadiolone est la baisse de MK4 entre J0 et J1 ($p < 0,001$), d'un facteur 8 environ.

IV.3.3.2.5. Dosage de la bromadiolone dans les différents organes étudiés

A J0, soit avant l'administration de bromadiolone, celle-ci n'est évidemment retrouvée dans aucun organe. Une forte concentration de bromadiolone est retrouvée dans le foie à partir de J1, avec une valeur moyenne de 9,00 $\mu\text{g/g}$ de foie (+/- 0,72). Elle diminue de manière significative entre J1 et J3 (Shapiro-Wilk, et test de Tukey – $p < 0,001$) et varie peu entre J3 et J4 ($p = 0,21$) (Figure 21 - gauche).

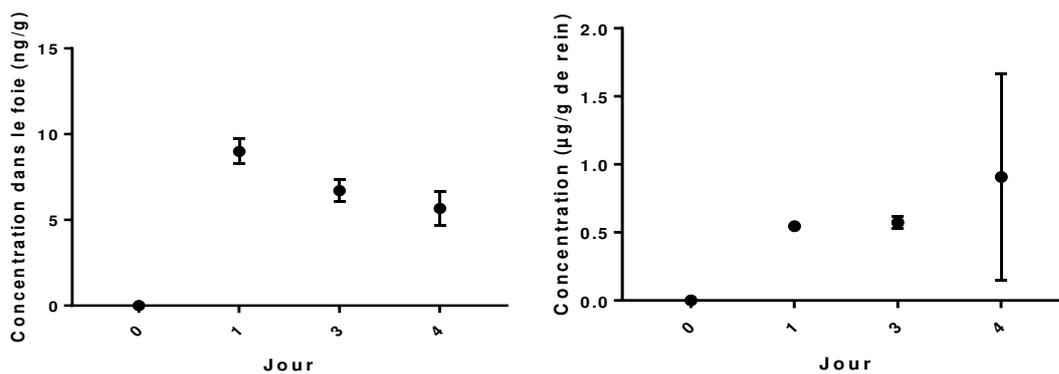


Figure 21 : Evolution de la bromadiolone dans le foie (à gauche) et dans le rein (à droite), en fonction du temps

Dans le rein, une concentration plus faible est retrouvée, par rapport au foie. En effet, la valeur moyenne est de 0,573 $\mu\text{g/g}$ (+/- 0,030) à J1, et tend à augmenter légèrement notamment à partir de J4 (Figure 21 - droite).

La bromadiolone n'est retrouvée dans aucun échantillon de poumon.

IV.3.4. Discussion

IV.3.4.1. Supplémentation et variations des taux basaux en vitamines dans le foie

L'étude A constitue avant tout un prérequis pour l'étude B, afin de déterminer l'effet de la supplémentation en K3 via l'aliment physiologique SAFE-04 distribué aux rats de laboratoire, ainsi que celui de l'administration de vitamine K1 SC de manière concomitante à l'intoxication volontaire en bromadiolone. Cependant certains résultats peuvent avoir une pertinence au-delà de ce cadre.

La première constatation de cette étude concerne les formes oxydées de la vitamine K1 et de MK4 : dans des conditions physiologiques, quel que soit l'apport exogène en K1 ou en K3, ces formes sont présentes en quantités similaires et faibles dans le foie, de l'ordre de la LOQ pour K1ox, et dans un intervalle allant jusqu'à environ 3 fois la LOQ pour MK4ox. On peut donc envisager qu'une accumulation des formes oxydées en l'absence de recyclage de la vitamine K suite à une intoxication aux rodenticides anticoagulants serait assez aisément détectable, et cette hypothèse sera discutée plus loin dans le cadre de l'étude B.

En l'absence de supplémentation en vitamine K1, celle-ci n'est détectée qu'à faible dose dans le foie (<LOQ), et sa concentration demeure faible suite à un apport en vitamine K3 : ces constatations sont cohérentes avec celles déjà observées chez le rat de laboratoire (Thijssen and Drittij-Reijnders, 1994). Elles suggèrent des taux physiologiques faibles en l'absence d'une source exogène de vitamine K1 chez le rat ainsi qu'une absence de conversion d'une autre source de vitamine K, la ménadione, en vitamine K1 dans l'organisme, et donc potentiellement une limite à la généralisation de son utilisation comme marqueur potentiel. Cependant les concentrations hépatiques en vitamine K1 deviendraient détectables chez le rat dès lors que les apports correspondent aux besoins physiologiques pour maintenir une coagulation normale (Kindberg and Suttie, 1989) : la limite concernerait donc essentiellement les individus en situation de carence, notamment liée à un jeun prolongé, puisqu'il a été montré que les réserves hépatiques baissaient rapidement en l'absence de nouvel apport. En revanche, on observe une forte capacité de stockage de la vitamine K1 dans le foie suite à une supplémentation massive, concordante avec la littérature sur le sujet (Koivu-Tikkanen et al., 2000). Il pourrait d'ailleurs être intéressant d'explorer les capacités de charge du foie en faisant varier la dose de vitamine K1 administrée, afin de vérifier une relation dose-réponse entre la vitamine K1 apportée et les concentrations hépatiques (Kindberg and Suttie, 1989). Dans une étude réalisée chez le chien, il a été observé une diminution des concentrations plasmatiques en vitamine K1 suite à une administration répétée, à la même dose, de cette vitamine (Mount and Kass, 1989) : un tel suivi serait pertinent également au niveau du foie. Cependant, dans le cadre des présentes études A et B, il a été conclu que la dose choisie pour l'étude A était trop importante, entraînant une saturation du système d'analyse. Ainsi pour l'étude B, il a été décidé de réduire l'apport en K1, de l'ordre de 10 fois moins.

Quant aux concentrations en MK4, elles restent stables quelle que soit la supplémentation, de l'ordre de 20-30 ng/g MF. Il est pourtant rapporté dans la littérature que la vitamine K1 et la vitamine K3 sont des précurseurs de la MK4 : la phylloquinone K1 serait convertie au sein des entérocytes en ménaquinone K2, elle-même convertie dans les tissus en MK4 par l'enzyme UBIAD1 (Hirota et al., 2013). Pour la vitamine K1, cette conversion a été observée aussi bien par voie orale que parentérale (Thijssen and Drittij-Reijnders, 1994), une hypothèse pour la voie parentérale étant l'existence d'un cycle entéro-hépatique. Ainsi les apports en vitamine K3 par l'eau de boisson et en vitamine K1 par voie sous-cutanée auraient dû entraîner l'augmentation des concentrations hépatiques en MK4, comme observé dans certaines études antérieures (Thijssen, Drittij-Reijnders, et Fischer 1996), sauf à envisager un seuil de saturation hépatique, possiblement au niveau de l'activité enzymatique de UBIAD1, déjà atteint par la supplémentation « basale » en ménaquinone via l'alimentation SAFE-04. Il aurait été intéressant de tester une carence vraie en vitamine K3 avec un aliment déplété pour déterminer les concentrations hépatiques en MK4 en l'absence de tout apport exogène. Il a été précédemment montré chez le rat que les concentrations hépatiques en MK4 étaient alors très faibles (Debaux et al., 2019 ; Thijssen and Drittij-Reijnders, 1994), ce qui pourrait également poser problème pour l'utilisation de ce marqueur dans des conditions d'apport alimentaire non contrôlées.

Ainsi cette étude questionne les taux physiologiques en vitamine K1 et en MK4 dans le foie chez les différentes espèces, en l'absence d'apport exogène contrôlé, dépendant du régime alimentaire de chaque espèce concernée : cela ouvre des pistes de recherche intéressantes. La MK4 présente chez le rat des concentrations variant peu quelle que soit l'importance de l'apport exogène, suggérant un « effet-plateau », ce qui pourrait en faire un marqueur intéressant s'affranchissant en partie du biais de la supplémentation (sous réserve que cette dernière reste suffisante pour atteindre des concentrations quantifiables). Il est important cependant de garder à l'esprit que cette étude demeure une étude-pilote, sur de très petits effectifs, et qu'il est difficile d'émettre des conclusions définitives.

IV.3.4.2. Dosages des vitamines de la vitamine K dans le foie, le poumon et le rein chez le rat intoxiqué à la bromadiolone : quels candidats potentiels à la fonction de biomarqueur de l'intoxication à la bromadiolone ?

IV.3.4.2.1. Dosage des vitamines et pertinence dans le diagnostic de l'intoxication à la bromadiolone

Dans l'étude B, il a été choisi de suivre l'évolution des concentrations de vitamines K1 et MK4, ainsi que de leurs formes époxydes. D'autres formes plus complexes de vitamine K2 telles que MK7 ou MK9 auraient pu être recherchées, néanmoins leurs concentrations semblent très faibles dans le foie et leur détection plus compliquée du fait de leur très forte lipophilie. Le run analytique aurait dû être allongé (d'environ 30 minutes pour la présente étude, il aurait dû être de 60 à 90 minutes selon la recherche de MK7 ou MK9), afin de pouvoir les éluer de la colonne de façon quantifiable en absence du bruit de fond. L'intérêt d'un biomarqueur est de pouvoir être utilisé en routine, son dosage doit donc être simple et rapide. La détection en LC-MS/MS avec une source d'ionisation à pression atmosphérique (APCI - non disponible dans le laboratoire ayant réalisé les analyses) pourrait être envisagée pour doser les formes plus complexes de vitamines K2. Des essais de dosage en LC-MS avec une source APCI ont été réalisés pour les formes K1 et MK4, mais la sensibilité n'est pas améliorée par rapport à la technique utilisée dans cette étude.

Le suivi de l'évolution des concentrations en K1 et MK4 a été réalisé dans 3 organes, le foie, le rein et le poumon. Le foie est l'organe privilégié de stockage des AVK (les concentrations en bromadiolone dans le foie étant, comme attendu, les plus fortes dans cette organe) et le lieu de synthèse des facteurs de coagulation. Le rein et le poumon sont des tissus souvent encore présents sur des cadavres d'animaux. Néanmoins, dans ces organes les concentrations en AVK sont en général assez faibles (dans la présente étude, la concentration en bromadiolone était 7 fois plus faible dans le rein que dans le foie), voire absentes (la bromadiolone était indétectable dans le poumon des rats traités lors de cette étude) et leur utilisation lors d'une suspicion d'intoxication en anticoagulants n'est pas forcément évidente puisqu'ils ne semblent pas des organes-cibles des AVK.

Dans le foie, on note avant tout une apparition de la forme oxydée de K1, K1ox, suite à l'administration de bromadiolone, ce qui pourrait constituer un marqueur intéressant. Cela a déjà été suggéré par Mount dans son étude sur le dosage des vitamines K1 réduite et oxydée dans le sérum de chien intoxiqué (Mount and Kass, 1989) et est cohérent avec les données de Thijssen chez des rats intoxiqués à la warfarine (Thijssen et al., 1996). Cependant K1ox est retrouvé à des

concentrations faibles, proches de la LOQ, avec une valeur moyenne à J1 de 7,7 ng/g MF, et qui restent stables au cours du temps (pas d'augmentation significative détectée), et ce, malgré des signes cliniques évidents d'intoxication observables à J4. Cela peut poser un souci de détection par certains appareillages, et en fait un marqueur peu fiable. Dans le poumon, K1ox est détecté dès J0 (LOQ), et ne varie pas de manière significative au cours du temps suite à l'administration de la bromadiolone. Comme pour le foie, K1ox n'est pas détecté dans le rein avant l'exposition à la bromadiolone, et est présent à des concentrations non quantifiables (assimilées à la LOQ) par la suite. Cependant, dans cet organe, il convient de noter qu'on ne retrouve pas d'accumulation de vitamine K1 à J0 (concentrations < LOQ), malgré la supplémentation par voie sous-cutanée : cette observation s'oppose aux résultats d'une autre étude chez le rat, qui montrait une accumulation de vitamine K1 dans le foie, le poumon et le rein suite à une supplémentation en vitamine K1 par voie orale à une dose inférieure à celle administrée dans la présente étude, correspondant environ à 0,05 mg/kg de poids vif (1,1 nmol/g d'aliment, converti en utilisant la masse molaire de la vitamine K1, de l'ordre de 450 g/mol, et une consommation journalière pour le rat de 100g/kg de poids vif)(Thijssen et al., 1996). On peut également rappeler que dans l'étude A, K1ox était détectée à des concentrations proches de la LOQ dans le foie, en l'absence de toute exposition aux AVK. Ainsi selon notre étude, la variation faible des concentrations brutes en K1ox semble donc un marqueur peu spécifique de l'intoxication aux AVK, en désaccord pourtant avec leur mécanisme d'action. D'autres techniques analytiques (comme par exemple, la LC-MS/MS couplée à une source APCI) pourrait éventuellement permettre d'atteindre des seuils de détection plus bas compatibles avec des variations de K1ox très faibles, et ainsi utiliser ce paramètre comme marqueur d'intoxication.

Comme dans l'étude A, la forme oxydée de MK4, MK4ox, est détectée dans tous les organes étudiés dès J0 (i.e., en l'absence de bromadiolone), avec des concentrations plus élevées dans le poumon (valeur moyenne de 15,2 ng/g MF), mais ne présente pas de variations significatives suite à l'intoxication (la seule variation significative observée étant une augmentation de la concentration entre J0 et J4 dans le foie). Comme pour K1ox, une technique plus sensible permettrait peut-être de déceler des variations plus fines dans les concentrations de MK4ox, mais à ce stade la pertinence de ce marqueur reste discutable.

Comme dans l'étude de Thijssen (Thijssen et al., 1996), on observe une baisse significative des concentrations en vitamine K1 et MK4 dans le foie suite à l'administration de la bromadiolone. Cette baisse est également significative dans le poumon pour les deux vitamines, tandis que seul MK4 diminue de manière significative dans le rein (K1 est détecté dans cet organe à des valeurs proches de la LOQ dès J0). Même si une telle baisse peut représenter un marqueur intéressant, son utilisation nécessite de connaître les éventuelles variations des taux basaux de K1 et MK4. L'espèce considérée,

l'alimentation ou encore la saisonnalité (Abi Khalil et al., 2021) sont autant de paramètres à explorer afin de déterminer s'ils influent ou non sur ces taux basaux. L'avantage de MK4 par rapport à K1 pourrait être que, selon l'étude A, son taux basal hépatique ne varie pas quel que soit l'apport en K1 ou K3, à partir d'un certain « plateau » supposé. A l'inverse, on a déjà montré que la concentration basale en vitamine K1 pouvait varier selon les apports exogènes en K1 et K3, et que cette vitamine présentait un taux basal faible dans le foie en l'absence de supplémentation : ainsi dans le cas d'un régime pauvre en vitamine K1, cette baisse pourrait ne pas être si importante ou même détectable.

Ainsi MK4 pourrait finalement être le marqueur le plus intéressant, puisqu'on constate une baisse significative dans le foie, le poumon et le rein suite à l'administration de la bromadiolone, et que, du moins dans le foie, son taux basal semble peu varier en fonction de l'apport extérieur : il s'agirait donc d'un paramètre exploitable dans trois organes facilement accessibles et échantillonnables lors d'autopsies de faune sauvage. Ce marqueur serait à interpréter conjointement avec un dosage des AVK effectué en parallèle, ainsi qu'éventuellement avec les signes nécropsiques observés. On notera par ailleurs que dans le poumon, la concentration basale en MK4 est supérieure à celle observée dans le foie, comme précédemment décrit par Ronden (Ronden et al., 1998b), et baisse de manière significative suite à l'administration de bromadiolone, malgré l'absence de détection de cet AVK dans ce tissu. Similairement, dans le rein, on constate également une baisse significative de MK4, malgré une concentration faible en bromadiolone. Cela soulève des questions quant aux mécanismes en jeu dans la déplétion en MK4 de ces organes « non-cibles » suite à une intoxication aux AVK. Même si la bromadiolone n'a pas d'action directe sur ces tissus, entraînerait-elle une mobilisation des réserves en MK4 extra-hépatique ?

IV.3.4.2.2. Privilégier l'utilisation des ratios entre formes oxydées et réduites ?

Nous avons soulevé plus haut la problématique d'une potentielle variabilité des taux basaux des différents vitamères selon différents critères, l'espèce, le sexe, l'alimentation, la saison, etc..., ainsi que celle d'une variation peu détectable des concentrations des formes oxydées K1ox et MK4ox, qui semblaient pourtant des marqueurs prometteurs en lien avec les mécanismes de l'intoxication aux AVK. Peut-on s'affranchir de ces limites en exploitant des ratios entre les formes oxydées et les formes réduites, plutôt que des concentrations brutes en vitamères ? L'utilisation de ceux-ci pourrait permettre de confirmer un diagnostic d'intoxication (Mount and Kass, 1989).

Considérant les valeurs faibles, voire nulles, déterminées pour les concentrations des formes oxydées K1ox et MK4ox, il s'agirait plutôt de privilégier un rapport [forme oxydée]/[forme réduite], avec une variabilité plus forte attendue au niveau du dénominateur du rapport.

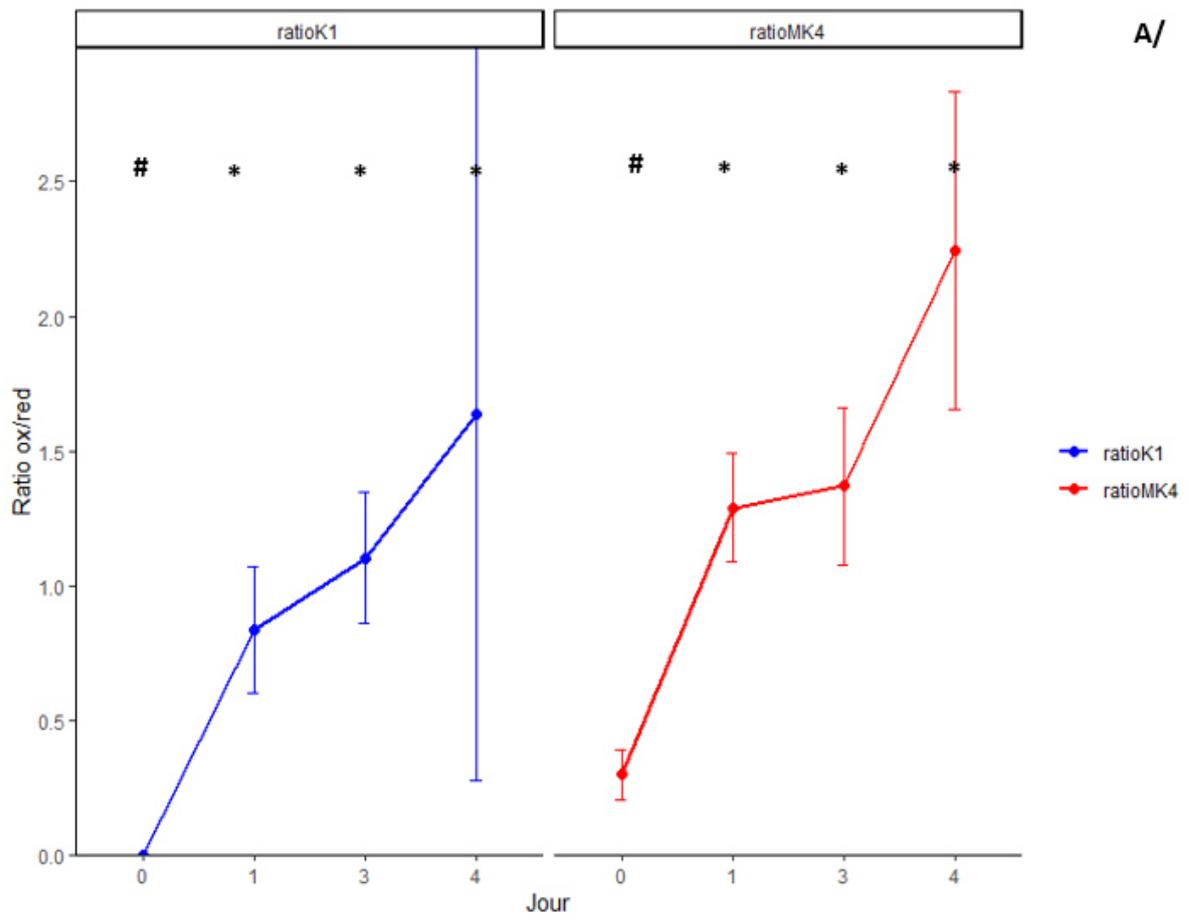
Le Tableau 11 présente le calcul des ratios pour l'étude A, tandis que la Figure 22 montre l'évolution de ces ratios calculés à partir des concentrations déterminées dans l'étude B dans le foie, le poumon et le rein.

Tableau 11 : Ratios « basaux » entre les concentrations en formes oxydées et réduites pour MK4 et K1 selon différentes conditions de supplémentation (étude A). . Le groupe non supplémenté correspond à un groupe d'animaux n'ayant pas reçu de supplémentation en vitamine K hormis celle reçue via son alimentation. Le groupe K1 a reçu une supplémentation en vitamine K1 pour voie sous-cutanée ; le groupe K3 a reçu une supplémentation en vitamine K3 par voie orale (eau de boisson) ; le groupe K1K3 a reçu les deux supplémentations.

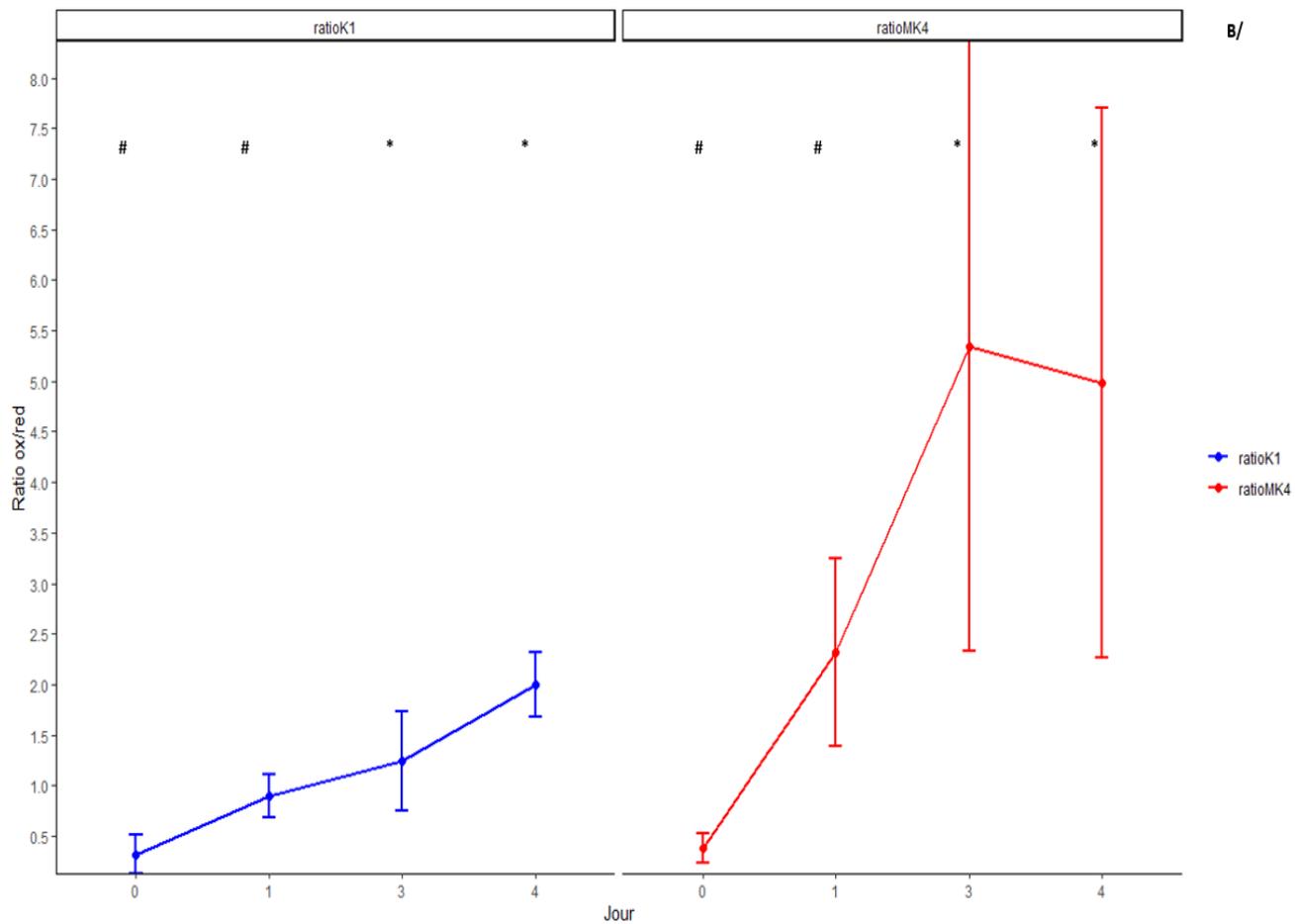
Groupe	Ratio forme oxydée/forme réduite			
	MK4		K1	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Non supp	0,17 ^a	0,11	1 ^a	0
K1	0,71 ^b	0,27	0.01 ^b	0.00
K1K3	0,64 ^b	0,16	0.01 ^b	0,00
K3	0,21 ^a	0,06	1 ^a	0

Une valeur de 1 pour le ratio correspond à des valeurs assimilées à la LOQ pour les formes oxydées et réduites.

Pour chaque vitamère, des lettres différentes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$) entre les ratios.



A/



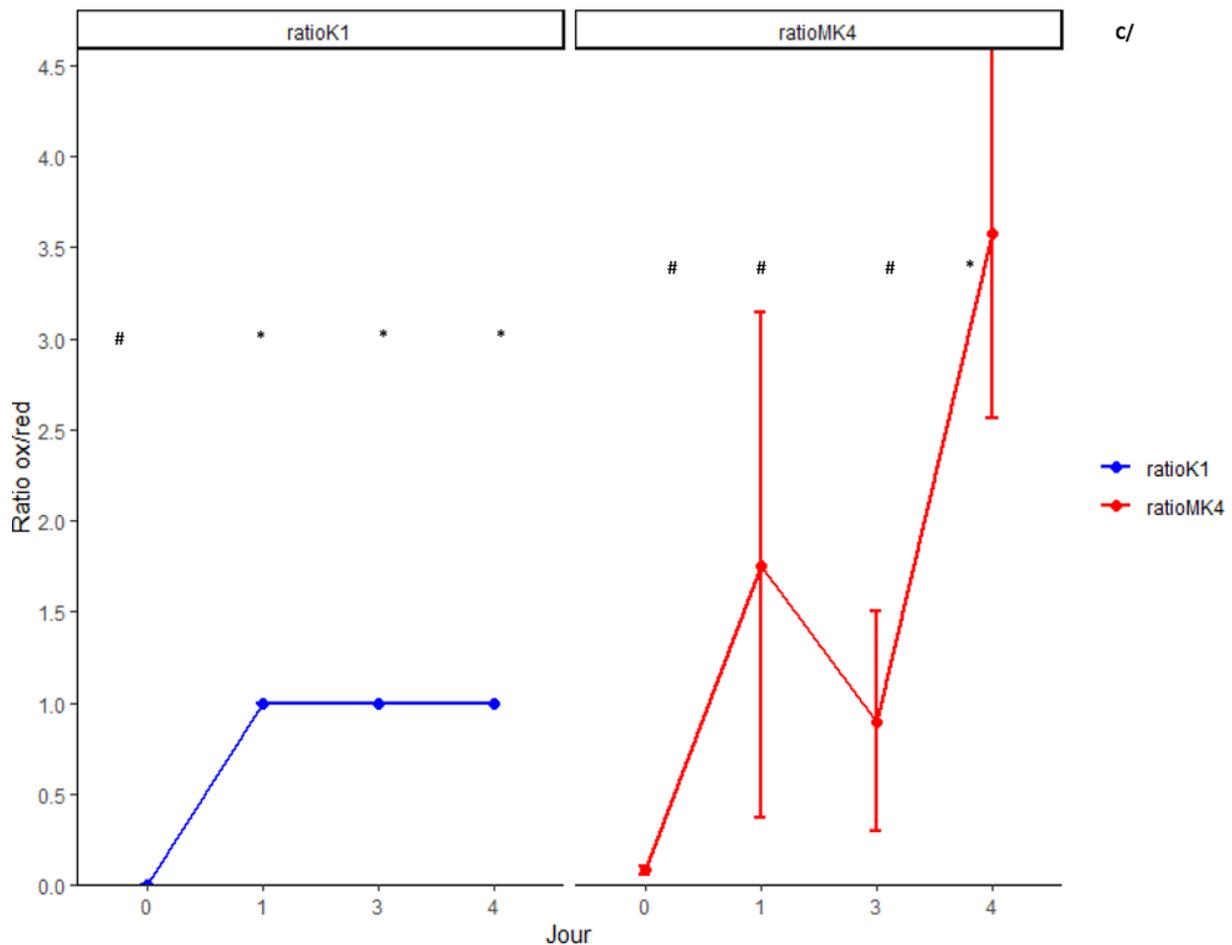


Figure 22: Evolution du rapport forme oxydée/forme réduite pour MK4 et K1 dans le foie (A), le poumon (B) et le rein (C), en fonction du jour post-intoxication à la bromadiolone (administration après J0). Pour chaque vitamine, les ratios avec des symboles différents sont significativement différents ($p < 0,05$ – comparaison à J0).

On observe, que ce soit pour MK4 ou K1, et dans tous les organes, une tendance à l'augmentation du ratio calculé, significative dès J1 dans le foie, et ce malgré l'absence de signes cliniques chez les rats. Ainsi les valeurs des ratios sont proches de 0 à J0 (avant administration de la bromadiolone) et supérieures ou égales à 1 pour les autres jours (Figure 22). A noter que le rapport K1ox/K1 n'est pas d'une grande pertinence dans le rein considérant la faible détection des formes de la vitamine K1 dans cet organe. La détermination des concentrations en vitamines et le calcul du ratio forme oxydée/forme réduite pourrait donc être un marqueur précoce de l'intoxication, et ce même en présence de l'antidote administré par voie sous-cutanée. Dans les conditions de cette étude, le ratio MK4 semble par ailleurs plus informatif, avec une amplitude moins importante de variation selon la supplémentation, notamment en vitamine K1 (Tableau 11).

L'utilisation de ce ratio permettrait de s'affranchir en partie des variations de concentrations tissulaires inter- et intra-espèces. Néanmoins, cela nécessite de vérifier à plus grande échelle leur

évolution en fonction du niveau basal de vitamine K1 et MK4. Une autre perspective à cette approche pourrait être d'explorer la relation dose-réponse entre les différents ratios et la concentration administrée en rodenticide, comme le suggère Schmidt (Schmidt et al., 1979), qui mentionne un potentiel effet plateau.

IV.3.4.4. Perspectives de l'étude

Cette étude n°3 étant une étude-pilote, elle permet d'envisager d'autres pistes d'investigation à mettre en œuvre pour mieux caractériser la pertinence des vitamères de la vitamine K comme marqueurs de la toxicité des AVK.

- Etude de la stabilité des différents marqueurs :

En nature, les carcasses ne sont généralement pas collectées dès la mort de l'animal : il est donc important, dans le but de déterminer un marqueur pertinent, de s'intéresser à sa conservation dans les différents organes en fonction notamment du temps, mais également de la température et de la luminosité.

- Variations en fonction du dosage de bromadiolone administré :

La dose de bromadiolone administrée dans cette étude correspond chez le rat à 4ED50 : cependant afin de valider l'utilisation potentielle des vitamères en tant que marqueur, il est important de s'intéresser à leurs variations, et à celles des ratios calculés, selon la dose de rodenticide administrée, en répétant le même protocole à des doses plus fortes de bromadiolone d'une part (10ED50), et à des doses sub-létales (0,5ED50 par exemple).

- Explorations des variations des taux basaux des vitamères :

Même si l'utilisation des ratios permet de s'affranchir en partie des taux basaux, une telle investigation semble intéressante pour faire suite à notre étude.

On peut ainsi envisager d'explorer les taux basaux en vitamine K chez d'autres espèces, principalement les espèces non-cibles susceptibles d'être exposées aux AVK. Parmi celles dont les échantillons sont facilement accessibles, le chien peut être un sujet intéressant, de même que les rapaces qui constituent un groupe très représenté dans la veille écotoxicologique.

Les variations saisonnières de ces vitamères chez les principales espèces non-cibles susceptibles d'être exposées aux AVK pourraient également être investiguées.

- Suivi dans le temps de l'évolution des formes oxydées :

La présente étude s'intéresse à l'évolution des concentrations en vitamines sur une très courte période de 4 jours : une autre perspective est l'allongement du temps d'expérimentation, afin notamment de suivre sur une durée plus longue l'évolution des formes oxydées. Néanmoins, cette étude ne peut être menée que pour des doses faibles en AVK n'entraînant pas la mort des animaux dans les 4 jours suivants l'ingestion. Cette étude permettrait d'apprécier un retour à la normale des facteurs envisagés.

V.DISCUSSION

Ce travail de doctorat a été consacré à l'apport d'une contribution à la question complexe mais majeure de distinction entre exposition environnementale et intoxication réelle aux rodenticides anticoagulants, afin de pouvoir évaluer le plus justement possible le risque actuel représenté par ces molécules sur la faune non-cible, sans sous- ni surestimation. Il convient en effet de ne pas emprunter des raccourcis faciles qui viseraient à assimiler la détection d'AVK dans certains tissus d'un individu non-cible à une intoxication avérée à ces molécules de l'individu en question. L'image ne peut être complète qu'avec une caractérisation concomitante des effets de ces résidus d'AVK sur l'organisme considéré : c'est pourquoi nous nous sommes intéressés dans ce mémoire à l'exploration des différents marqueurs, cliniques et biologiques, susceptibles d'alimenter des conclusions quant à la toxicité des AVK lors d'investigations *ante* ou *post-mortem*.

Un premier travail de bilan des marqueurs existants et potentiels a été l'occasion d'initier une réflexion sur les critères permettant de définir un « bon » marqueur de la toxicité des AVK, qui seront redéveloppés ici. Par la suite, les études réalisées sur le terrain, pour l'une dans le cadre d'une exposition primaire, et l'autre d'une exposition secondaire, ont permis de tester la pertinence de certains des marqueurs évoqués dans la revue : le tableau clinique et la présence d'hémorragies, l'exploration de la cascade de coagulation, et les concentrations en AVK dans des fluides et tissus d'intérêt pour les investigations sur les intoxications tels que le plasma, le lait et le foie. Elles constituent également une illustration assez parlante de la complexité et des limites du diagnostic de la toxicité des AVK, que nous évoquerons dans un second axe de cette discussion. Enfin, une étude de laboratoire préliminaire a permis de poser les premiers jalons d'une utilisation éventuelle du dosage de la vitamine K comme marqueur de la toxicité des AVK : les principaux points d'intérêt de cette étude seront repris dans le dernier axe de cette partie.

V.1. Quels critères d'évaluation de la pertinence d'un marqueur de la toxicité des AVK ?

Il a été proposé dans l'**article 1** une série de critères qui pourraient aider à mieux définir la pertinence d'un (bio)marqueur de la toxicité des rodenticides anticoagulants. Ces critères sont les suivants :

- Le stade de développement du marqueur : est-ce que le biomarqueur est simplement au stade de l'idée, ou déjà utilisé dans un cadre de recherche, ou suffisamment standardisé pour être utilisé sur le terrain ?
- Son utilisation sur animal mort et/ou vivant,
- L'existence de valeurs-seuil de référence pour ce marqueur et pour l'espèce considérée,
- La compatibilité du marqueur avec un éventuel traitement de l'intoxication à la vitamine K : le marqueur est-il utilisable pour évaluer l'exposition ou la toxicité des AVK même suite à l'administration de l'antidote (vitamine K1) ?
- Sa significativité toxicologique : est-ce qu'une relation causale entre la réponse du marqueur et l'effet sur l'organisme est démontrée ?
- Sa sensibilité : est-ce que le marqueur permet de détecter même des intoxications débutantes aux AVK, ou simplement de confirmer une intoxication symptomatique ?
- Sa spécificité : existe-t-il des facteurs de confusion pour ce marqueur ?

On notera avant tout que les critères proposés dans cet article ont été définis à la fois pour des marqueurs d'exposition aux AVK et pour des marqueurs d'effet. Finalement, établir l'exposition de la faune non-cible aux rodenticides est relativement aisé, et c'est plutôt à l'évaluation de leurs effets sur les organismes exposés que nous nous intéressons ici.

Il est important dans le contexte des investigations de la toxicité des AVK de réfléchir à des marqueurs non invasifs, utilisables en *ante-mortem* notamment dans un contexte clinique pour diagnostiquer et décider du traitement de l'intoxication, par opposition à des marqueurs potentiellement plus invasifs, applicables dans un contexte nécropsique et utilisables notamment dans la veille toxicologique *post-mortem* sur les populations sauvages non-cibles. Dans le contexte *ante-mortem*, la question de l'interférence entre le traitement antidotique à base de vitamine K1 et la réponse du marqueur testé est importante dans le diagnostic de l'intoxication : par exemple, en cas de suspicion d'exposition aux AVK chez le chien, il est recommandé d'effectuer une mesure du temps de Quick 48h après l'exposition pour évaluer si celle-ci a été à l'origine d'une intoxication pour l'animal ou non (Murphy, 2012). Cette exploration du temps de Quick ne peut cependant être mise en place qu'en l'absence de traitement antidotique, ce qui peut représenter un risque pour l'animal sur le délai de 48h nécessaire pour effectuer le test. Ainsi le développement d'un marqueur permettant d'initier un traitement rapidement sans que sa réponse ne soit affectée pourrait être bénéfique.

La significativité toxicologique désigne dans ce contexte le lien plausible entre la réponse observée du marqueur et les effets du rodenticide sur l'organisme. Réfléchir à cette significativité revient essentiellement à travailler sur les mécanismes de l'intoxication aux AVK selon l'Adverse Outcome Pathway (AOP) décrit notamment par Rattner et al. (Rattner et al., 2014b). Cette méthode vise à appréhender toutes les voies potentielles d'effets indésirables de ces molécules, en réfléchissant à leurs actions à toutes les échelles, de la réponse moléculaire à la réponse populationnelle. Un tel travail permet de dégager des pistes de recherche pour de nouveaux biomarqueurs, en répertoriant toutes les voies biologiques potentiellement impactées par la molécule dont on cherche à caractériser la toxicité. La Figure 23 représente cette réflexion pour les AVK, en intégrant à la fois leurs effets connus sur la cascade de coagulation, et ceux moins investigués liés aux autres PVKD.

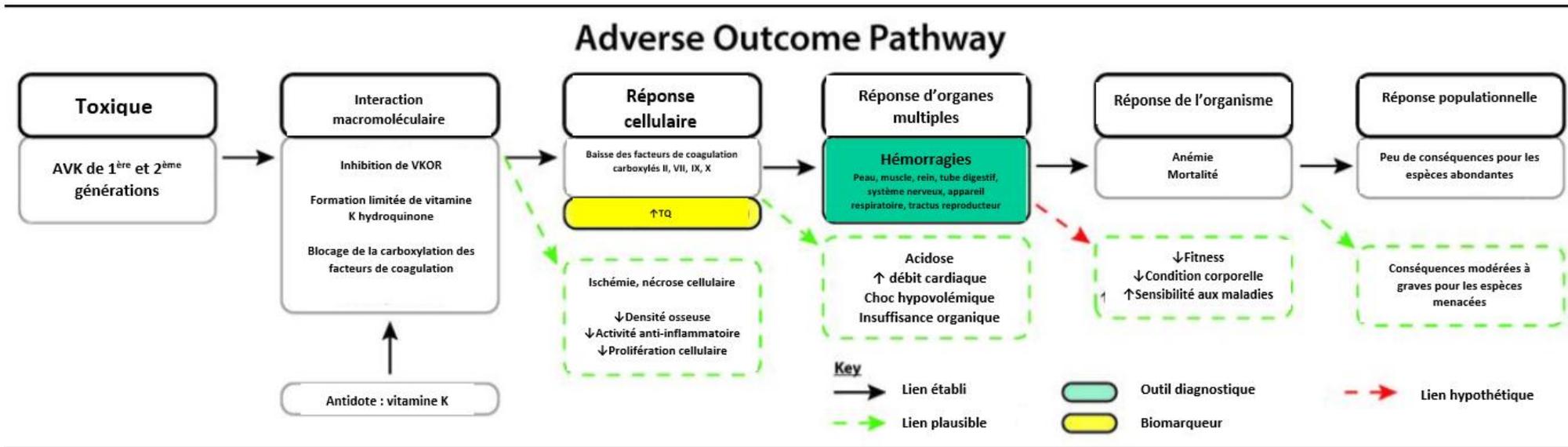


Figure 23 : Chemin des effets adresses (AOP) (traduit de Barnett et al., 2014)

Sont proposés également parmi les critères pour évaluer un bon marqueur la définition de sa sensibilité et de sa spécificité. Ces deux notions sont généralement associées aux tests diagnostiques, avec la définition dans la population testée de 4 catégories (Lalkhen and McCluskey, 2008):

- Les vrais positifs, dont le résultat du test est positif et qui ont réellement la maladie,
- Les faux positifs, dont le résultat est positif sans que l'individu testé ne soit malade,
- Les faux négatifs, dont le résultat est négatif alors que les individus ont la maladie,
- Les vrais négatifs, avec un résultat négatif chez des individus non malades.

On peut appliquer cette notion aux marqueurs de la toxicité, selon un tableau de contingence adapté (Tableau 12).

Tableau 12 : Tableau de contingence adapté aux marqueurs de la toxicité des AVK

	Intoxication +	Intoxication -
Marqueur +	VP	FP
Marqueur -	FN	VN

VP : Vrai Positif ; FP : Faux Positif ; FN : Faux Négatif ; VN : Vrai Négatif

Ainsi, dans ce cadre, la sensibilité Se est la probabilité que le marqueur soit positif si l'intoxication est réellement présente, ce qui correspond globalement à la définition utilisée dans l'**article 1**. On a :

$$Se = VP / (VP + FN)$$

La spécificité Sp du marqueur est quant à elle la probabilité que le marqueur soit négatif si l'intoxication est absente, avec :

$$Sp = VN / (VN + FP)$$

Dans l'**article 1**, le terme « spécificité » tel que défini correspondrait plutôt à la valeur prédictive positive (VPP) qui est la probabilité que l'intoxication soit présente lorsque le marqueur est positif. Une bonne VPP s'obtient en l'absence de facteurs de confusion qui pourraient augmenter le nombre de faux-positifs. La VPP se calcule comme suit :

$$VPP = VP / (VP + FP),$$

Mais également :

$$VPP = 1 - FDR,$$

avec FDR, le “False Discovery Rate”, tel que

$$\text{FDR} = \text{FP}/(\text{FP}+\text{VP})$$

Il est à noter tout de même qu’il existe un lien entre Sp et VPP. En effet une autre formule pour VPP est la suivante :

$$\text{VPP} = \text{Se} \times \text{Pr} / [\text{Se} \times \text{Pr} + (1 - \text{Sp}) (1 - \text{Pr})] ,$$

avec Pr la prévalence dans la population étudiée (dans notre cas, la prévalence de l’intoxication). Ainsi au vu de cette formule une augmentation de la VPP passe par une augmentation de la spécificité du marqueur Sp et/ou de la prévalence de l’intoxication Pr. Dans le reste de la discussion, on utilisera donc le terme « spécifique » pour un marqueur, dans le sens où il possède peu de facteurs de confusion et donc une bonne valeur prédictive positive.

Pour les marqueurs de la toxicité des AVK on recherche plusieurs critères liés à la fois à une bonne Se, à une bonne Sp, et également à une bonne VPP :

- Savoir identifier tous les cas d’intoxication (maximiser VP, et donc Se),
- Savoir également distinguer les cas d’exposition qui ne sont pas des cas d’intoxication (maximiser VN – et donc Sp, diminuer FP),
- Avoir une bonne fiabilité du marqueur, i.e. une probabilité élevée que l’intoxication soit présente lorsque le marqueur est positif (maximiser VPP).

On peut donc réfléchir à la pertinence des biomarqueurs en ces termes. Cependant, un prérequis est nécessaire pour pouvoir appliquer le tableau de contingence tel que défini ici (Tableau 12) : celui de définir exactement ce qu’on considère comme une intoxication vraie aux rodenticides anticoagulants, i.e. de savoir identifier la population des individus VP et FN.

V.2. Une définition complexe de la toxicité des rodenticides anticoagulants

L’interrogation soulevée au précédent paragraphe est bien la première étape du raisonnement à franchir, et qui n’a pas de réponse réellement satisfaisante à mesure que les connaissances évoluent sur les mécanismes d’action des AVK : comment définit-on une intoxication aux AVK, et qu’est-ce qui la caractérise au mieux ? En effet, dans le cadre des tests diagnostiques, le développement d’un nouveau test, et l’évaluation de sa spécificité et de sa sensibilité, se font en confrontant les résultats obtenus à un test de référence, ou « gold standard », qui permet de définir dans la population les individus effectivement atteints (i.e., la sous-population VP + FN selon le nouveau test). Or dans le

cadre des intoxications aux AVK, quel est ce « gold standard » ? Est-ce qu'un marqueur déjà existant pourrait remplir ce rôle ?

Nous discuterons ici des différents marqueurs évalués dans les études réalisées sur le terrain, selon les critères définis précédemment, et en essayant d'apporter des éléments de réponse à la question de la définition de la toxicité des rodenticides anticoagulants.

V.2.1. Le tableau clinique, à la base du diagnostic de la toxicité des AVK ?

Initialement, le tableau clinique (ou nécropsique, pour les investigations *post-mortem*) n'est pas un biomarqueur, sauf à prendre une définition élargie du terme prenant en compte les effets du contaminant étudié sur l'individu dans son intégralité, voire sur la population. C'est pourquoi il a été choisi tout au long de ce travail de se référer plutôt au terme de « marqueur », qui englobe ainsi tous les outils diagnostiques disponibles pour caractériser la toxicité des AVK.

Quand on se réfère au tableau clinique de l'intoxication aux rodenticides, on y associe généralement l'idée de tableau hémorragique. Celui-ci illustre la toxicité aiguë des AVK : les hémorragies macroscopiques, cavitaires, sont facilement observables lors d'autopsies en *post-mortem*, et certaines hémorragies peuvent également être visibles en *ante-mortem* (Murphy, 2012), soit parce que les saignements s'externalisent (hémoptisie, saignements nasaux, méléna), ou parce que des signes moins spécifiques donnent lieu à des examens complémentaires (par exemple, troubles respiratoires évocateurs d'hémorragies pulmonaires). Certaines hémorragies peuvent être de nature microscopique, et doivent être recherchées sur tissus frais par histologie (Murray, 2011, 2018; Niedringhaus et al., 2021; Rattner et al., 2011).

La présence d'hémorragies peut donc être un marqueur important de la toxicité des AVK. Un postulat souvent utilisé pour caractériser une intoxication aux rodenticides est la combinaison de la détection de résidus d'AVK dans les tissus et de l'observation d'hémorragies (Murray, 2018). Cependant, les limites de ce postulat ont pu être testées dans l'étude s'intéressant à l'exposition secondaire aux AVK chez les rapaces (**article 3**) : il ne peut en effet s'appliquer qu'en l'absence d'autres causes de mortalité, or, dans notre étude, si un grand nombre d'individus présentaient des troubles hémorragiques associés à la détection de résidus d'AVK, la majorité d'entre eux ont été diagnostiqués avec d'autres causes susceptibles d'entraîner des hémorragies, comme un traumatisme ou une électrocution. On notera au passage qu'il n'a pas pu être vérifié dans cette étude l'hypothèse précédemment émise dans la littérature d'une favorisation de la mort par trauma liée à la présence de résidus d'AVK dans l'organisme (Elmeros et al., 2011; Fournier-Chambrillon et

al., 2004), puisqu'aucune différence significative au niveau de la charge hépatique en AVK n'a pu être mise en évidence entre les individus présentant des hémorragies et ceux n'en présentant pas, parmi les oiseaux morts de trauma. De plus, même en ne retenant dans la population de rapaces que les individus avec une cause de mort inconnue, seulement 4 étaient des « candidats » possibles à un diagnostic d'intoxication par les AVK, et seulement 2 ont pu être considérés comme intoxiqués probables, combinant un tableau hémorragique marqué et la détection de niveaux élevés d'AVK dans les échantillons de foie. Par ailleurs, chez ces 2 individus, il était rapporté dans le compte-rendu d'autopsie une absence de caillot sanguin post-mortem dans la cavité cardiaque : ce critère nécropsique (absence/présence d'un caillot) était consigné de manière assez systématique dans les enregistrements de la base de données utilisée pour l'étude sur les rapaces. Le caillot post-mortem, d'aspect rouge, humide, et se détachant facilement, se forme spontanément à la mort de l'individu, suite à l'arrêt de la circulation sanguine (Ross et al., 2014). Cependant son usage dans le diagnostic nécropsique des intoxications aux AVK est assez empirique, et peu de littérature est disponible quant à son caractère informatif. On sait qu'une lyse du caillot se produit dans les jours suivant la mort, et que ce type de caillot est peu présent dans des cas de mort soudaine (Mole, 1948) : on ne peut donc rien conclure d'une absence de caillot à l'autopsie. En revanche, ce caillot étant composé de fibrine, sa présence serait plutôt suggestive d'une coagulation fonctionnelle, et pourrait donc être un critère en défaveur d'une intoxication aux AVK.

Ainsi, la présence seule d'hémorragies chez un individu exposé ne suffit pas à conclure à une intoxication aux AVK, et le diagnostic différentiel est important pour ne pas surestimer l'effet délétère de ces molécules. Ce marqueur n'est donc pas spécifique. Selon la définition qu'on accorde à la toxicité des AVK, il n'est pas sensible non plus : en effet, comme mentionné plus haut, le tableau clinique hémorragique est un reflet de la toxicité aiguë et marquée des AVK, résultant de leur action sur la cascade de coagulation. Il ne prend donc pas en compte les éventuels effets sub-létaux de ces molécules, par leur action sur d'autres voies métaboliques (autres PVKD). Par ailleurs, en lien avec les différences de sensibilité entre les espèces, l'intensité des manifestations cliniques peut ne pas être directement corrélée avec le niveau d'exposition aux AVK : ainsi dans l'étude réalisée sur les brebis exposées à la chlorophacinone (**article 2**), aucun animal exposé n'a présenté de signes cliniques dans le mois suivant l'exposition, malgré des concentrations plasmatiques élevées (> 500 ng/mL) et l'augmentation du TQ chez certains individus. Le tableau clinique ne permet également pas de préjuger du risque pour la consommation humaine des denrées produites par les animaux exposés, quand ceux-ci sont des espèces de rente. Dans l'état des connaissances actuelles, les manifestations cliniques ne peuvent donc pas être considéré comme le paramètre de référence pour diagnostiquer l'intoxication.

V.2.2. L'exploration de la coagulation, un « gold standard » du diagnostic de l'intoxication ?

Comme vu dans la partie introductive de ce travail, l'exploration de la coagulation, et notamment la mesure du temps de Quick TQ, est considérée comme un outil diagnostique majeur des intoxications aux AVK. Le TQ est même fréquemment assimilé au « gold standard » clinique de ce diagnostic (Lefebvre et al., 2017; Murphy, 2002; Rozanski et al., 1999; Waddell et al., 2013; Woody et al., 1992). Il a donc été choisi de s'intéresser à ce paramètre dans l'étude portant sur l'exposition primaire de brebis laitières à la chlorophacinone, pour explorer l'atteinte clinique de ces animaux, et tenter de corrélérer manifestations cliniques, variations du TQ et taux plasmatiques et dans le lait en AVK. Il a été observé dans cette étude une augmentation significative du TQ 72h après l'exposition chez les animaux considérés comme « exposés » (i.e., qui présentaient des concentrations plasmatiques en chlorophacinone quantifiables) par rapport aux animaux « non exposés », de l'ordre de 137% chez les animaux présentant des taux plasmatiques entre 50 et 500 ng/mL, et de 185% chez ceux présentant des concentrations plus élevées, supérieures à 500 ng/mL. Ces variations sont similaires à celles déjà observées chez d'autres ruminants exposés aux AVK (Berny et al., 2006; Bullard et al., 1976; Martin et al., 1991; Thompson et al., 1972), et interviennent en l'absence de toute manifestation clinique d'intoxication : on peut donc conclure que ce biomarqueur est plus sensible, puisqu'il permet de détecter des modifications de la cascade de coagulation, même sans que celles-ci aient des conséquences cliniques de type hémorragique au moment du test. Il permettrait de définir une population « à risque », exposée aux AVK à des taux suffisants pour altérer les mécanismes de coagulation, et donc potentiellement plus sensible à d'autres sources de stress environnementaux. Cependant, comme chez le chien (Waddell et al., 2013), nous n'avons pas pu démontrer de relation linéaire entre les concentrations en AVK détectées dans les tissus (plasma et lait) et l'intensité de l'augmentation du TQ : un « effet plateau » semble intervenir pour des concentrations supérieures à environ 500 ng/mL dans le plasma, et 4 ng/mL dans le lait (cf Figure 14 p. 96). Ces observations mériteraient d'être répétées en lien avec des expositions à d'autres AVK, chez d'autres espèces.

L'utilisation du TQ n'a pas pu être testée dans notre étude sur les expositions secondaires chez les rapaces. En effet, outre le fait qu'il s'agit d'un test moins standardisé chez les oiseaux (cf partie II.3), il n'est pas utilisable en *post-mortem*. En humaine, il a été suggéré l'utilisation de la protéine induite par l'absence de vitamine K / antagoniste-II (PIVKA-II), aussi appelée prothrombine des- γ -carboxylée, pour l'investigation post-mortem des troubles de la coagulation (Rutty et al., 2003) : cette protéine

serait stable pour au moins 72h et pourrait persister jusqu'à 7 jours suite au décès. Ce test ne doit pas être confondu avec le PIVKA test, ou Thrombotest, mentionné dans l'**article 1** : alors que le Thrombotest mesure un temps de coagulation, sur des modalités relativement similaires à celles du TQ, il s'agit ici d'utiliser la PIVKA-II comme biomarqueur, détecté qualitativement par un test immunologique. Cette piste pourrait être intéressante pour les investigations *post-mortem* de la coagulation, même si la présence de PIVKA-II n'est pas spécifique de troubles de la coagulation liés à un antagonisme de la vitamine K, et est plus fréquemment utilisée en humaine comme un marqueur de carcinome hépatocellulaire (Saitta et al., 2017). De plus, se poserait la problématique de la détection inter-espèce, étant donné que celle-ci se base sur une réaction antigène/anticorps : l'usage d'un tel marqueur nécessiterait une spécificité d'espèce faible pour le test (au niveau des anticorps utilisés) et/ou une variabilité peu importante de la séquence de PIVKA-II entre les espèces.

Il est important de noter qu'une augmentation isolée du TQ n'est pas spécifique d'un antagonisme de la vitamine K : elle peut également correspondre à une déficience héréditaire du facteur VII, à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou encore à une insuffisance hépatique (eClinPath.com, Cornell University, <https://eclinpath.com/hemostasis/tests/screening-coagulation-assays/>, consulté le 24/09/2021). Il est donc important que cette exploration de la coagulation s'accompagne d'une suspicion préalable d'exposition, voire d'une confirmation par la mesure des taux d'AVK dans les tissus. Une autre limite de l'utilisation du TQ, ou plus globalement des temps de coagulation, comme marqueur de la toxicité des AVK, est la restriction de l'évaluation de leur effet seulement à la cascade de coagulation, sans prendre en compte d'autres voies métaboliques. De plus, comme déjà mentionné plus haut, ce marqueur n'est plus pertinent en cas d'initiation du traitement antidotique à base de vitamine K. Le statut de « gold standard » du TQ pour caractériser les effets de AVK est donc probablement à nuancer.

V.2.3. Quantification des résidus d'AVK dans les tissus : biomarqueur d'exposition, mais aussi d'effet ?

La mesure des concentrations en AVK dans les tissus a été réalisée dans le cadre des deux études menées sur le terrain, d'une part sur animal vivant (plasma, lait – **article 2**) et d'autre part sur animal mort (foie – **article 3**). Cette quantification représente un très bon marqueur de l'exposition aux rodenticides anticoagulants. Cependant, les travaux décrits dans la littérature, dont nous avons fait un résumé en partie II, ainsi que nos propres études, cherchent à établir une corrélation entre concentrations en AVK et effets cliniques de ces substances, par la définition d'une valeur-seuil ; il

s'agit ainsi de transformer un biomarqueur d'exposition quantitatif en un marqueur d'effet dichotomique établissant la présence ou non d'une intoxication chez les individus concernés.

Dans l'étude menée chez les brebis exposées à la chloropacinone (**article 2**), l'investigation de cette corrélation s'est basée sur l'évolution du TQ : on a ainsi pu observer une augmentation significative à t+72h de ce temps de coagulation pour des concentrations plasmatiques en chlorophacinone supérieures à 50 ng/mL. Cette valeur pourrait donc représenter un « seuil » plasmatique pour les concentrations en chlorophacinone, chez l'espèce ovine. De plus, une corrélation a été établie entre les concentrations en chlorophacinone dans le lait et celles dans le plasma : le lait constituerait donc un échantillon moins invasif pour caractériser les concentrations circulantes chez les individus exposés, et donc la probabilité d'intoxication. Cependant, une limite certaine à ces conclusions est l'exposition des animaux étudiés à un AVK unique, de première génération : en effet, les AVK de première génération circulent de manière plus importante dans le compartiment sanguin, tandis que ceux de 2^{ème} génération s'accumulent préférentiellement dans le foie et ne circulent que de manière transitoire dans le compartiment sanguin (Chetot et al., 2020a; Huckle et al., 1989; Watt et al., 2005). Ainsi, le dosage des AVK dans le sang peut être source de faux négatifs, notamment chez les individus exposés à des rodenticides de seconde génération. Cela illustre l'importance du choix de la matrice à échantillonner pour réaliser ces dosages. Les différences pharmacocinétiques existantes entre les AVK ne permettent pas d'extrapoler les résultats de l'étude. De plus, la mesure des concentrations plasmatiques a été réalisée à 72h post-exposition, il est donc probable que les concentrations initiales, et donc le seuil d'exposition définissant réellement l'atteinte des voies de la coagulation, aient été plus élevées. On notera également qu'en lien avec la différence de sensibilité entre les espèces (cf paragraphe II.1.4), les résultats obtenus dans l'espèce ovine ne sont pas extrapolables aux autres espèces.

La veille écotoxicologique réalisée dans la 2^{ème} étude de terrain sur les rapaces (**article 3**) a permis de s'intéresser à la corrélation entre exposition globale aux AVK (détection de tous les AVK présents dans les échantillons de foie, caractérisation de la charge hépatique par sommation des résidus d'AVK de seconde génération) et présence d'hémorragies chez les individus autopsiés. Comme vu précédemment, la présence d'hémorragies n'est sans doute pas le paramètre de référence pour caractériser la toxicité des AVK, mais il reste le plus accessible dans le cadre d'investigations nécropsiques. Aucune corrélation significative n'a pu être établie entre les concentrations hépatiques en AVK de seconde génération et la présence d'hémorragies chez les individus autopsiés ; le test du seuil de 100 ng/g MF (Newton et al., 1999) n'a pas donné de résultats concluants non plus. Ce seuil, ainsi que d'autres propositions de seuils plus faibles établies en lien avec des probabilités de mortalité (Thomas et al., 2011), ont été définis en l'absence de toute autre cause diagnostiquée de

mortalité. Ceci représente une limite importante de notre étude sur les rapaces : au sein de cet échantillon pourtant conséquent (156 prélèvements analysés), on retrouve une prévalence importante d'hémorragies, mais généralement en lien avec des traumatismes ou des électrocutions. Cette prévalence importante des traumatismes et électrocutions est cohérente, sachant que ces causes représentent une part majeure de la mortalité chez les rapaces sauvages (Barrientos et al., 2012; Barrios and Rodríguez, 2004; Hunt et al., 2017; Jenkins et al., 2010), mais elle est problématique pour nos investigations. Cependant, même en excluant cette source de biais, aucune différence significative dans les concentrations hépatiques en AVK n'a pu être mise en évidence entre les individus présentant ou non des hémorragies. On a vu précédemment qu'une hypothèse d'intoxication aux AVK n'avait été retenue que pour 2 individus de l'étude (1,3% des échantillons) : si ce taux faible de mortalité lié aux AVK est cohérent avec ce qui a pu être rapporté récemment dans la littérature (Niedringhaus et al., 2021), relativisant l'impact de ces molécules sur les rapaces non-ciblés, il rend plus difficile l'établissement de marqueurs pertinents pour évaluer la toxicité de ces substances. Compte tenu de l'hétérogénéité de la population d'étude, il n'a pas été possible non plus de prendre en compte les différences éventuelles de sensibilité entre les espèces de rapace, car les tailles d'échantillon pour chacune étaient trop faibles. La conversion des concentrations hépatiques en masse molaire, potentiellement plus représentative de la puissance de chaque AVK, n'a pas permis d'apporter des conclusions différentes dans le cadre de cette étude. Ainsi l'**étude 2** n'apporte pas d'éléments concluants quant à la définition d'une valeur-seuil de concentration en AVK pour définir la toxicité des AVK : il est possible que le paramètre de référence choisi en accord avec la littérature sur le sujet (présence d'hémorragie) n'ait pas été le plus discriminant pour permettre l'établissement d'une telle valeur, ou encore que l'utilisation d'un seuil de résidus, avec toutes les limites inhérentes à sa généralisation, ne soit pas la piste la plus pertinente pour améliorer la caractérisation de la toxicité des AVK en *post-mortem*.

L'exploration de la relation dose-effet reste donc à approfondir, mais peut-être pas à l'échelle macroscopique/nécropsique. Le choix du comparateur est critique dans la définition d'un seuil, et il semblerait selon nos études que l'exploration de la coagulation, notamment via la mesure du TQ, soit le paramètre de référence le plus pertinent si on s'intéresse à la toxicité aiguë des AVK : des études contrôlées sont menées sur le sujet par des chercheurs nord-américains, pour corréler doses administrées en AVK et impacts mesurables sur la cascade de coagulation (Rattner et al., 2010) . Des investigations sont également rapportées par ces chercheurs sur l'établissement de modèles pharmacocinétiques pour un AVK de première génération, la diphacinone, chez les rapaces prédateurs, et ce domaine intéresse également notre unité de recherche lyonnaise. La modélisation PBPK (pharmacocinétique basée sur la physiologie), au cœur des nouvelles techniques d'évaluation

du risque pour les pesticides (Mallick et al., 2020), pourrait également être un outil pertinent pour l'extrapolation d'un seuil de toxicité entre les espèces.

V.2.4. Vers une meilleure caractérisation de la toxicité des AVK ?

Les études menées sur le terrain illustrent parfaitement la complexité du diagnostic de la toxicité des AVK. Suite à nos investigations, il apparaît qu'un autre critère pour évaluer la pertinence des marqueurs pourrait être ajouté à la liste proposée dans l'article 1, se basant sur la phase de l'intoxication aux AVK à laquelle on s'intéresse. Le tableau clinique serait plutôt un marqueur tardif, reflétant une intoxication en phase avancée, tandis que le TQ serait un marqueur plus précoce, qui permet notamment d'initier la décision de traitement antidotique même en l'absence d'effets délétères visibles. Un dosage des facteurs de la coagulation, que nous n'avons pas testé dans nos études, pourrait être lui un facteur très précoce. A l'inverse, que rechercher en *post-mortem* ? Ici la précocité du marqueur semble être moins importante que sa fiabilité.

Par ailleurs, tous les marqueurs présentés jusqu'à présent s'intéressent essentiellement à la toxicité aiguë ou sub-aiguë des AVK, et à leurs effets sur la coagulation sanguine. Cependant, ne faut-il pas élargir ce cadre pour essayer de mieux prendre en compte les effets sub-létaux de ces substances ? Quid de l'investigation des autres voies métaboliques, notamment via l'exploration des autres PVKD, ou de l'inhibition de l'activité de VKOR ? Une approche plus globale serait peut-être nécessaire, en investissant le champ des « omiques » : ainsi la métabolomique, couplée à une analyse statistique multivariée, pourrait permettre de dégager une batterie de marqueurs potentiels pour mieux caractériser la toxicité des rodenticides. Toutes ces techniques sont brièvement discutées dans l'article 1. Finalement, un début de réponse est peut-être qu'il n'y a pas une mais des toxicités différentes des AVK, avec la nécessité de définir au préalable à quels effets on s'intéresse, en introduisant éventuellement un critère supplémentaire pour les marqueurs investigués, pour distinguer marqueurs de la toxicité aiguë et marqueurs de la toxicité chronique ou sub-chronique. S'intéresser directement à la cible des rodenticides, c'est-à-dire la vitamine K et son recyclage, est également une piste qui a fait l'objet de nos investigations préliminaires.

V.3. La vitamine K, une piste prometteuse pour caractériser la toxicité des AVK ?

Il est difficile d'apporter une réponse définitive à ce questionnement uniquement sur la base des études préliminaires réalisées dans ce travail de thèse. Cependant ces données nouvelles, venant

s'ajouter à celles déjà disponibles dans la littérature, permettent d'amorcer une réflexion sur l'utilisation des vitamines K comme marqueurs de l'intoxication aux AVK.

Nous discuterons ici des deux vitamines abordées dans ce travail, la vitamine K1 et la ménaquinone-4 MK4.

V.3.1. Evolution des formes réduites et oxydées de la vitamine K1 dans les tissus chez le rat

La littérature concernant les explorations de la vitamine K1 et de sa forme époxyde est peu abondante et relativement ancienne. On peut citer dans ce domaine l'étude de Mount et Kass, datant de 1989 (Mount and Kass, 1989), qui se sont intéressés à l'évolution des vitamines K1 et K1ox dans le plasma de chien, mettant en avant le potentiel diagnostique de ce vitamère dans les intoxications aux AVK.

Il a été observé dans notre travail sur le rat de laboratoire des taux faibles de vitamine K1 dans le foie en l'absence d'apport exogène en phylloquinone, similairement à d'autres études sur le sujet, chez le rat volontairement carencé (Thijssen and Drittij-Reijnders, 1994) ou dans le plasma chez le chien recevant une diète normale (Mount and Kass, 1989). Ceci pourrait constituer une limite dans l'utilisation de ce marqueur, potentiellement présent à faible concentration de manière physiologique, notamment chez les animaux en situation de jeun prolongé, comme cela peut être le cas chez la faune sauvage non-cible. Cependant il a été montré chez le rat une quantification possible de la vitamine K1 dans le foie dès lors que les apports correspondent aux besoins physiologiques pour maintenir une coagulation normale, tandis que les concentrations dans le plasma n'augmentent significativement qu'à partir d'une supplémentation supérieure aux besoins physiologiques (Kindberg and Suttie, 1989). Cette limite peut donc être nuancée, et les taux physiologiques chez les différentes espèces méritent des investigations supplémentaires, notamment chez les espèces herbivores comme le campagnol terrestre *Arvicola terrestris*, qui semble présenter une résistance aux AVK basée sur sa diète enrichie en vitamine K1 (Abi Khalil et al., 2021).

En revanche, une supplémentation en vitamine K1 sous-cutanée permet d'obtenir chez le rat des concentrations élevées en ce vitamère : la supplémentation à raison de 1 mg/kg de poids vif entraîne une saturation de l'analyseur, avec des concentrations hépatiques moyennes de l'ordre de 1000 ng/g MF, tandis qu'une supplémentation de 0,1 mg/kg entraîne une accumulation modérée de vitamine K1 dans le foie mais également dans le poumon. Suite à l'administration de bromadiolone, les concentrations en vitamine K1 baissent de manière significative dans ces deux organes, et celles en vitamine K1ox semblent augmenter de manière non significative, notamment à partir de J4. Le ratio K1ox/K1 évolue lui de valeurs proches de zéro en l'absence d'AVK, à des valeurs ≥ 1 suite à

l'administration de la bromadiolone, plus tardivement pour le poumon par rapport au foie. Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés chez le chien dans le plasma : par ailleurs le ratio $K1_{ox}/K1$ augmente très fortement, de manière irrégulière, dans les 3 semaines qui suivent l'administration de la diphénadione dans le plasma des chiens exposés, tandis que les valeurs de ce ratio chez les animaux contrôles restent basses (de l'ordre de 0,01 à 0,1). Une telle augmentation du ratio dans le foie est également retrouvée chez le rat supplémenté oralement en phylloquinone 24h après une intoxication à la warfarine, tandis qu'elle n'est pas visible dans le poumon (Thijssen and Driittij-Reijnders, 1994). Ainsi le dosage de la vitamine K1 et de sa forme époxyde, et le calcul du ratio $K1_{ox}/K1$ semblent des marqueurs non invasifs intéressants à mesurer dans le plasma pour un diagnostic précoce chez des animaux vivants exposés et ayant reçu au moins une première dose de traitement antidotique, et le dosage en *post-mortem* dans des organes comme le foie ou le poumon pourrait également être probant, sous réserve de travailler sur des espèces ayant des taux basaux en vitamine K1 suffisants pour être détectés. L'utilisation d'une technique d'analyse plus sensible pourrait éventuellement pallier à cette limite chez des espèces ayant des taux physiologiques faibles en vitamine K1. Des investigations sur d'autres tissus présentant des concentrations basales en vitamine K1 plus élevées même en l'absence de supplémentation comme l'os (notamment le sternum) est une autre piste (Thijssen and Driittij-Reijnders, 1994).

V.3.2. Evolution des formes réduites et oxydées de MK4 dans les tissus chez le rat

Selon l'état actuel des connaissances, la MK4 serait synthétisée dans les organes (principalement extra-hépatiques) via une enzyme nommée UBIAD1 (Nakagawa et al., 2010). Cette enzyme aurait une activité principalement de prénylation de la ménadione (vitamine K3) circulante, cette ménadione pouvant être issue du catabolisme de la vitamine K1 exogène au niveau des entérocytes (Hirota et al., 2015, 2013). Cependant ces résultats ont été obtenus chez le rat, et les voies de production pourraient différer chez d'autres mammifères à la flore intestinale très différente, comme par exemple les ruminants : cela mérite d'être plus investigué. Dans notre étude, la configuration de carence stricte n'a pas été testée, puisque les rats recevaient un apport exogène en vitamine K1 et/ou en vitamine K3. Cependant, si on se réfère à l'étude de Thijssen et al. (Thijssen and Driittij-Reijnders, 1994), les mêmes limitations que celles vues pour la vitamine K1 semblent exister pour MK4, avec des concentrations basales en l'absence de supplémentation très faibles dans les organes d'intérêt de notre étude, i.e. le foie, le poumon et le rein, tandis qu'elles sont relativement élevées dans d'autres tissus comme le pancréas, la glande sous-maxillaire ou encore le sternum (de l'ordre de 100 à 200 pmol/g, i.e. environ 44 à 88 ng/g en prenant la masse molaire de la

ménaquinone-4, de 444 g/mol). Cependant, les formes oxydées représentent dans ces tissus une part prépondérante de la MK4 dosée (20 à 40%) en l'absence de tout blocage du cycle de recyclage, ce qui limite leur potentiel pour explorer les effets des AVK. Il ressort également de cette étude que les concentrations en MK4 sont très faibles dans le plasma chez le rat, ce qui, si extrapolable à d'autres espèces, ne permettrait pas l'utilisation de ce marqueur pour une exploration non invasive chez l'animal vivant. De plus, les concentrations sanguines reflèteraient les apports alimentaires récents, donc seraient moins pertinentes.

A l'inverse, chez des animaux non carencés, recevant un apport en ménadione via l'alimentation et en vitamine K1 par voie parentérale, la MK4 semble un marqueur intéressant pour des investigations *post-mortem*. On a en effet montré que sa forme réduite est quantifiable dans le foie, le poumon et le rein, avec des concentrations plus élevées dans les deux derniers organes, et que ses concentrations diminuent significativement suite à l'administration de bromadiolone ; ces données sont cohérentes avec celles précédemment rassemblées chez les rats intoxiqués à la warfarine, qui présentaient également une baisse significative de MK4 24h suite à l'administration de l'AVK (Thijssen and Drittij-Reijnders, 1994). Aucune variation significative n'a pu être montrée pour MK4ox quel que soit l'organe, mais en revanche l'utilisation du ratio MK4ox/MK4 semble intéressante, à l'image du ratio K1ox/K1, avec un ratio basal qui varie moins quel que soit l'importance de l'apport exogène (entre 0,2 et 0,6 selon le groupe dans l'étude 3A, dans le foie), supposément en lien avec une saturation de l'enzyme de conversion UBIAD1, et une augmentation de ce rapport suite à l'intoxication à la bromadiolone (>1 dans tous les tissus analysés), plus marquée à J4 post-intoxication.

Ainsi les conclusions de nos travaux sont limitées quant à l'intérêt des vitamères de la vitamine K dans le diagnostic des intoxications aux rodenticides anticoagulants. Cependant de nos résultats et de la littérature existante sur le sujet peuvent émerger plusieurs pistes de recherche :

- La vitamine K1, et le ratio K1ox/K1, mesurés dans le plasma, pourraient servir de marqueur diagnostique précoce chez l'animal vivant ayant reçu un traitement antidotique, mais pas MK4.
- Dans le cadre des investigations *post-mortem*, le ratio des concentrations K1ox/K1 et MK4ox/MK4 mesuré dans le foie, le poumon ou le rein (seulement MK4) peut constituer un indicateur de l'intoxication, avec des ratios présentant des valeurs très supérieures à 1 dans les jours suivant la consommation de l'AVK.

La vitamine K ne s'impose donc pas à l'heure actuelle comme le nouveau « gold standard » définissant la toxicité des AVK, mais des études à plus large échelle pourraient permettre de mieux caractériser son potentiel en tant que biomarqueur de l'intoxication. De telles études sont en cours dans ce sens au laboratoire.

On peut donc conclure qu'il n'existe pas de marqueur actuellement qui remplisse le cahier des charges, mais qu'il s'agirait plutôt de travailler sur une combinaison de marqueurs. En combinant tous les marqueurs disponibles, il est éventuellement possible de répondre sur la caractérisation d'une intoxication, mais on reste dans du diagnostic probabiliste.

VI.CONCLUSION

Ce travail de thèse s'est intéressé aux marqueurs permettant de mieux caractériser la toxicité primaire et secondaire des rodenticides anticoagulants, afin de pouvoir évaluer le risque représenté par ces substances pour la faune non-cible, et de pouvoir distinguer exposition environnementale et intoxications réelles. Suite à une revue bibliographique explorant les différents aspects inhérents aux AVK, *i.e.* leurs utilisations, leur mode d'action, les voies d'exposition de la faune non-cible domestique et sauvage, nos investigations se sont déclinées en trois grands axes.

Le premier axe a consisté en une revue critique de la littérature existante sur les différents marqueurs disponibles, en proposant notamment des critères permettant d'évaluer la pertinence des différents marqueurs, comme son stade de développement, son utilisation pour des investigations *ante* ou *post-mortem*, les interférences possibles avec le marqueur d'un traitement antidotique à la vitamine K, sa significativité toxicologique, ou encore sa sensibilité et sa spécificité. Ces critères ont été repris par la suite pour discuter des marqueurs testés dans nos études. Le bilan des marqueurs potentiels de la toxicité des AVK s'est voulu aussi exhaustif que possible, couvrant aussi bien des marqueurs déjà utilisés en routine comme les temps de coagulation ou le dosage des AVK dans les tissus, que des marqueurs au stade de recherche comme l'activité de VKOR ou celles des facteurs de coagulation, ou encore au stade vraiment expérimental comme le dosage des PVKD comme l'ostéocalcine ou la MGP sous-carboxylée, en évoquant également d'autres pistes de recherche comme l'utilisation des « omiques » (génomique, métabolomique) pour cribler les modifications à différentes échelles entraînées par l'exposition aux AVK. Cet inventaire a pointé des limites pour chaque marqueur potentiel, même ceux déjà largement utilisés dans le diagnostic, et a permis de sélectionner les marqueurs à tester sur le terrain.

L'évaluation de la pertinence de certains marqueurs déjà existants sur le terrain s'est faite par le biais de deux études. La première, sur une exposition primaire de brebis laitières à un rodenticide de première génération, la chlorophacinone, a permis d'établir une corrélation non linéaire entre les concentrations plasmatiques et dans le lait de cet AVK, et son effet sur la cascade de coagulation mesuré par le temps de Quick. Cependant, les limites principales à ces conclusions consistent en l'absence d'une vraie relation dose-réponse entre les concentrations retrouvées et l'augmentation du temps de Quick, avec un « effet plateau » observé, ainsi qu'en la nature de l'AVK testé, de première génération : les résultats sont difficilement généralisables aux AVK de seconde génération, puisque leur fraction circulante dans le compartiment sanguin est moindre, et donc une telle corrélation entre concentrations plasmatiques et augmentation du temps de Quick n'aurait peut-être

pas été observée. La deuxième étude s'est basée sur la veille toxicologique réalisée depuis une dizaine d'années par le CNITV sur les carcasses de rapaces retrouvées dans le quart sud-est de la France, afin d'évaluer l'exposition secondaire de ces rapaces aux AVK, et de tester la corrélation entre niveaux d'AVK retrouvés en *post-mortem* dans le foie de ces oiseaux et probabilité d'intoxication, évaluée par la présence d'hémorragies à l'autopsie. Comme déjà observé dans de précédentes études sur le sujet, il s'est avéré que l'établissement d'un seuil de toxicité, basé sur la sommation des résidus hépatiques d'AVK de seconde génération, était complexe. En effet, le critère de référence auxquels sont confrontés ces niveaux de contamination, i.e. la présence d'hémorragies, n'est pas spécifique, puisque possiblement observable suite à d'autres causes de mortalités comme un traumatisme, une électrocution ou encore un phénomène infectieux, et par conséquent aucune corrélation significative n'a pu être démontrée. De plus, face à une population de rapaces hétérogène, un tel seuil n'est pas généralisable, en lien avec les différentes sensibilités d'espèces. Enfin, ce seuil, s'il pouvait être établi, correspond plutôt à un seuil de létalité qu'à un seuil de toxicité prenant en compte les effets sub-létaux potentiels des AVK. Ainsi, une des conclusions majeures de cette étude est que l'établissement d'un seuil de concentration pour évaluer la toxicité des AVK n'est peut-être pas le marqueur d'effet le plus pertinent, ou du moins que le critère de référence choisi pour l'établir n'est sans doute pas le plus approprié. Il a par ailleurs été proposé dans la littérature d'utiliser plutôt des concentrations molaires en AVK, pour mieux prendre en compte la puissance de chaque AVK dans l'évaluation des niveaux de résidus : cela a été testé dans notre étude, mais les conclusions tirées n'étaient pas différentes à notre échelle de celles établies en utilisant les concentrations massiques.

Le dernier volet de notre travail a consisté en une exploration préliminaire d'un marqueur potentiel peu investigué jusqu'à présent, i.e. l'évolution des concentrations en vitamères de la vitamine K dans différents tissus, et notamment des formes oxydées de ces vitamères, en présence d'une exposition à une dose létale à un AVK, la bromadiolone, et donc d'un blocage potentiel de leur recyclage. Il a été choisi de s'intéresser dans une étude pilote de laboratoire chez le rat aux concentrations de deux vitamères, la phylloquinone (K1) et la ménaquinone-4 (MK4) dans des tissus facilement accessibles en *post-mortem* que sont le foie, le poumon et le rein. Un dosage dans le plasma aurait également pu être intéressant, pour évaluer la pertinence du marqueur en *ante-mortem*, comme suggéré par de précédentes études. Les conclusions de cette étude pilote, réalisée à petite échelle dans des conditions contrôlées chez le rat, sont limitées et peu extrapolables, mais elles ouvrent des pistes de recherches intéressantes notamment concernant l'utilisation des ratios [forme oxydée]/[forme réduite] pour la vitamine K1 et la MK4, qui semblent augmenter dans le temps suite à une intoxication à un AVK, passant de valeurs proches de zéro avant exposition, notamment pour la

vitamine K1, à des valeurs >1 dans les 24h qui suivent l'intoxication. Ce ratio pourrait donc être un marqueur précoce de l'intoxication aux AVK. Cette étude préliminaire s'inscrit dans un axe de travail plus important mené par l'unité de recherche, et des publications plus développées sur le sujet devraient paraître dans les années à venir.

Finalement, la question de départ de ce travail de thèse n'est pas réellement élucidée, mais il faut avouer qu'espérer y apporter une réponse définitive aurait été un projet trop ambitieux quand on considère les années de recherche déjà consacrées à cette thématique. Pourtant, il apporte des éléments supplémentaires à la réflexion sur le sujet, et de manière plus globale sur la définition à apporter à la toxicité des AVK. On pourrait introduire un nouveau niveau de classification des marqueurs potentiels, en lien avec la nature de la toxicité des AVK investiguée. Ainsi, il apparaît qu'on peut distinguer deux grands types de marqueurs :

- Les marqueurs de la toxicité aiguë des AVK, très investigués : cette toxicité aiguë se caractérise essentiellement par leur effet sur la cascade de coagulation. Parmi les marqueurs testés pour cette catégorie, on a pu voir que le tableau clinique hémorragique était un paramètre peu spécifique et peu sensible mais facilement observable, et peut constituer un élément d'orientation du diagnostic en présence d'une intoxication sévère. L'exploration de la coagulation via la mesure des temps de coagulation apparaît à l'heure actuelle comme le paramètre de référence le plus pertinent, très sensible et spécifique en présence d'une suspicion forte d'exposition. Le dosage des facteurs de coagulation pourrait être une autre piste à explorer. L'établissement d'un seuil de toxicité pour les concentrations en AVK dans les tissus, et la relation dose-effet, restent à approfondir mais une réflexion supplémentaire est sans doute nécessaire pour choisir le comparateur le plus pertinent : à l'heure actuelle le choix s'orienterait plutôt vers la mesure des temps de coagulation, mais on peut également envisager le développement de modèles pharmacocinétiques pour les différents AVK, ainsi que l'utilisation de la modélisation, notamment la modélisation PBPK, pour permettre une extrapolation entre les espèces.
- Les marqueurs de la toxicité chronique ou sub-chronique des AVK : ceux-ci restent encore à définir, puisqu'il n'y a pas de consensus à l'heure actuelle sur les potentiels effets sub-létaux des AVK. Une approche sans a priori (de type « omique ») pourrait peut-être permettre de définir de nouveaux biomarqueurs pertinents.

Ce travail ouvre donc d'autres questionnements et d'autres pistes de recherches futures sur le sujet.

VII. REFERENCES

- Abi Khalil, R., Barbier, B., Fafournoux, A., Mahamat, A.B., Marquez, A., Poissenot, K., Keller, M., Desvars-Larrive, A., Fernandez-De-Simon, J., Coeurdassier, M., Benoit, E., Lefebvre, S., Pinot, A., Lattard, V., 2021a. Seasonal diet-based resistance to anticoagulant rodenticides in the fossorial water vole (*Arvicola amphibius*). *Environ. Res.* 200, 111422. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111422>
- Alabau, E., Mentaberre, G., Camarero, P.R., Castillo-Contreras, R., Sánchez-Barbudo, I.S., Conejero, C., Fernández-Bocharán, M.S., López-Olvera, J.R., Mateo, R., 2020. Accumulation of diastereomers of anticoagulant rodenticides in wild boar from suburban areas: Implications for human consumers. *Sci. Total Environ.* 738, 139828. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139828>
- Albert, C.A., Wilson, L.K., Mineau, P., Trudeau, S., Elliott, J.E., 2010. Anticoagulant rodenticides in three owl species from Western Canada, 1988–2003. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 451–459. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9402-z>
- Alomar, H., Chabert, A., Coeurdassier, M., Vey, D., Berny, P., 2018. Accumulation of anticoagulant rodenticides (chlorophacinone, bromadiolone and brodifacoum) in a non-target invertebrate, the slug, *Deroceras reticulatum*. *Sci. Total Environ.* 610–611, 576–582. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.117>
- Badry, A., Krone, O., Jaspers, V.L.B., Mateo, R., García-Fernández, A., Leivits, M., Shore, R.F., 2020. Towards harmonisation of chemical monitoring using avian apex predators: Identification of key species for pan-European biomonitoring. *Sci. Total Environ.* 731, 139198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139198>
- Barrientos, R., Ponce, C., Palacín, C., Martín, C.A., Martín, B., Alonso, J.C., 2012. Wire Marking Results in a Small but Significant Reduction in Avian Mortality at Power Lines: A BACI Designed Study. *PLOS ONE* 7, e32569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032569>
- Barrios, L., Rodríguez, A., 2004. Behavioural and environmental correlates of soaring-bird mortality at on-shore wind turbines: Bird mortality at wind power plants. *J. Appl. Ecol.* 41, 72–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2004.00876.x>
- Bean, T.G., Rattner, B.A., 2018. Environmental contaminants of healthcare origin: exposure and potential effects in wildlife, in: *Health Care and Environmental Contaminants*. Elsevier, pp. 87–122.
- Berkner, K.L., Runge, K.W., 2004. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* 2, 2118–2132. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00968.x>
- Berny, P., Esther, A., Jacob, J., Prescott, C., European Commission, Directorate-General for the Environment, 2014. Study on risk mitigation measures for anticoagulant rodenticides as biocidal products: final report. Publications Office, Luxembourg.
- Berny, P.J., de Oliveira, L.A., Videmann, B., Rossi, S., 2006. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 67, 363–371. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.2.363>
- Berry, C.R., Gallaway, A., Thrall, D.E., Carlisle, C., 1993. Thoracic Radiographic Features of Anticoagulant Rodenticide Toxicity in Fourteen Dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound* 34, 391–396. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1993.tb02026.x>
- Boitet, M., Hamed, A., Chatron, N., Debaux, J.V., Benoit, E., Lattard, V., 2018. Elevated difenacoum metabolism is involved in the difenacoum-resistant phenotype observed in Berkshire rats homozygous for the L120Q mutation in the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*Vkorc1*) gene: Resistance to difenacoum of Berkshire rats. *Pest Manag. Sci.* 74, 1328–1334. <https://doi.org/10.1002/ps.4797>

- Bolton-Smith, C., Price, R.J., Fenton, S.T., Harrington, D.J., Shearer, M.J., 2000. Compilation of a provisional UK database for the phylloquinone (vitamin K1) content of foods. *Br. J. Nutr.* 83, 389–399.
- Booth, S.L., 2012. Vitamin K: food composition and dietary intakes. *Food Nutr. Res.* 56, 10.3402/fnr.v56i0.5505. <https://doi.org/10.3402/fnr.v56i0.5505>
- Booth, S.L., Suttie, J.W., 1998. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J. Nutr.* 128, 785–788. <https://doi.org/10.1093/jn/128.5.785>
- Boyle, C.M., 1960. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature* 188, 517–517. <https://doi.org/10.1038/188517a0>
- Brakes, C.R., Smith, R.H., 2005. Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *J. Appl. Ecol.* 42, 118–128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.00997.x>
- Buckle, A.P., Prescott, C.V., Ward, K.J., 1994. Resistance to the first and second generation anticoagulant rodenticides—a new perspective. *Vertebr. Pest Conf.* 16 138–144.
- Buckle, A.P., Smith, R.H. (Eds.), 2015. *Rodent pests and their control*, 2nd edition. ed. CAB, Wallingford, Oxfordshire ; Boston, MA.
- Bullard, R.W., Thompson, R.D., Holguin, G., 1976. Diphenadione residues in tissues of cattle. *J. Agric. Food Chem.* 24, 261–263. <https://doi.org/10.1021/jf60204a010>
- Bullard, R.W., Thompson, R.D., Kilburn, S.R., 1977. Diphenadione residues in milk of cattle. *J. Agric. Food Chem.* 25, 79–81. <https://doi.org/10.1021/jf60209a042>
- Butler, S.E., 2011. The sub-lethal effects of second generation anticoagulant rodenticides on birds (thesis). University of Leicester.
- Cancela, M.L., Conceição, N., Laizé, V., 2012. Gla-Rich Protein, a New Player in Tissue Calcification? *Adv. Nutr.* 3, 174–181. <https://doi.org/10.3945/an.111.001685>
- Cavaco, S., Viegas, C.S.B., Rafael, M.S., Ramos, A., Magalhães, J., Blanco, F.J., Vermeer, C., Simes, D.C., 2016. Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1051–1065. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2033-9>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1998. Update: leptospirosis and unexplained acute febrile illness among athletes participating in triathlons—Illinois and Wisconsin, 1998. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 47, 673–676.
- Chetot, T., Mouette-Bonnet, M., Taufana, S., Fourel, I., Lefebvre, S., Benoit, E., Lattard, V., 2020a. Differences in teratogenicity of some vitamin K antagonist substances used as human therapeutic or rodenticide are due to major differences in their fate after an oral administration. *Toxicol. Lett.* 333, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.034>
- Chetot, T., Taufana, S., Benoit, E., Lattard, V., 2020b. Vitamin K antagonist rodenticides display different teratogenic activity. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 93, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.02.003>
- Coeurdassier, M., Villers, A., Augiron, S., Sage, M., Couzi, F.-X., Lattard, V., Fourel, I., 2019. Pesticides threaten an endemic raptor in an overseas French territory. *Biol. Conserv.* 234, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.03.022>
- Cowan, P.E., Gleeson, D.M., Howitt, R.L., Ramón-Laca, A., Esther, A., Pelz, H.-J., 2017. Vkorc1 sequencing suggests anticoagulant resistance in rats in New Zealand. *Pest Manag. Sci.* 73, 262–266. <https://doi.org/10.1002/ps.4304>
- Cox, P., Smith, R.H., 1992. Rodenticide ecotoxicology: Pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. *Vertebr. Pest Conf.* 15 165–170.
- Dalmeijer, G.W., van der Schouw, Y.T., Magdeleyns, E., Ahmed, N., Vermeer, C., Beulens, J.W.J., 2012. The effect of menaquinone-7 supplementation on circulating species of matrix Gla protein. *Atherosclerosis* 225, 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.019>
- Damin-Pernik, M., Espana, B., Besse, S., Fourel, I., Caruel, H., Popowycz, F., Benoit, E., Lattard, V., 2016. Development of an Ecofriendly Anticoagulant Rodenticide Based on the Stereochemistry of Difenacoum. *Drug Metab. Dispos.* 44, 1872–1880. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.071688>

- Damin-Pernik, M., Espana, B., Lefebvre, S., Fourel, I., Caruel, H., Benoit, E., Lattard, V., 2017. Management of Rodent Populations by Anticoagulant Rodenticides: Toward Third-Generation Anticoagulant Rodenticides. *Drug Metab. Dispos.* 45, 160–165. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.073791>
- Danziger, J., 2008. Vitamin K-dependent Proteins, Warfarin, and Vascular Calcification. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 3, 1504–1510. <https://doi.org/10.2215/CJN.00770208>
- Debaux, J.V., Hammed, A., Barbier, B., Chetot, T., Benoit, E., Lefebvre, S., Lattard, V., 2019. Establishment of the Variation of Vitamin K Status According to *Vkorc1* Point Mutations Using Rat Models. *Nutrients* 11, 2076. <https://doi.org/10.3390/nu11092076>
- Delattre, P., Giraudoux, P., 2009. *Le campagnol terrestre - Prévention et contrôle des populations*, Editions Quae. ed, Savoir faire.
- Doerr, J.A., Wyatt, R.D., Hamilton, P.B., 1975. Investigation and Standardization of Prothrombin Times in Chickens. *Poult. Sci.*
- Dowding, C.V., Shore, R.F., Worgan, A., Baker, P.J., Harris, S., 2010. Accumulation of anticoagulant rodenticides in a non-target insectivore, the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Environ. Pollut.* 158, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.017>
- Eadsforth, C.V., Gray, A., Huckle, K.R., Inglesfield, C., 1993. The dietary toxicity of flocoumafen to hens: Elimination and accumulation following repeated oral administration. *Pestic. Sci.* 38, 17–25. <https://doi.org/10.1002/ps.2780380104>
- Elliott, J.E., Hindmarch, S., Albert, C.A., Emery, J., Mineau, P., Maisonneuve, F., 2014. Exposure pathways of anticoagulant rodenticides to nontarget wildlife. *Environ. Monit. Assess.* 186, 895–906. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3422-x>
- Elmeros, M., Christensen, T.K., Lassen, P., 2011. Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats *Mustela erminea* and weasels *Mustela nivalis* from Denmark. *Sci. Total Environ.* 409, 2373–2378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.03.006>
- Enouri, S., Dekroon, K., Friendship, R., Dowling, P.M., 2015. Depletion of bromadiolone in tissues of hogs following oral exposure. *J. Swine Health Prod.* 23, 8.
- Esmon, C.T., Sadowski, J.A., Suttie, J.W., 1975. A new carboxylation reaction. The vitamin K-dependent incorporation of H-14-CO₃- into prothrombin. *J. Biol. Chem.* 250, 4744–4748.
- Espín, S., García-Fernández, A.J., Herzke, D., Shore, R.F., van Hattum, B., Martínez-López, E., Coeurdassier, M., Eulaers, I., Fritsch, C., Gómez-Ramírez, P., Jaspers, V.L.B., Krone, O., Duke, G., Helander, B., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., van den Brink, N.W., 2016. Tracking pancontinental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use? *Ecotoxicology* 25, 777–801. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1636-8>
- Ferland, G., 2012. The Discovery of Vitamin K and Its Clinical Applications. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 213–218. <https://doi.org/10.1159/000343108>
- Fernandez, F., Collins, M.D., 1987. Vitamin K composition of anaerobic gut bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 41, 175–180. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02191.x>
- Foley, S.R., Solano, C., Simonova, G., Spanevello, M.M., Bird, R.J., Semple, J.W., Jackson, D.E., Schibler, A., Fraser, J.F., Fung, Y.L., 2014. A comprehensive study of ovine haemostasis to assess suitability to model human coagulation. *Thromb. Res.* 134, 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.05.026>
- Fourel, I., Berlioz-Barbier, A., Benoit, E., 2020. Mass spectrometry characterization of anticoagulant rodenticides and hydroxyl metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 34. <https://doi.org/10.1002/rcm.8871>
- Fourel, I., Damin-Pernik, M., Benoit, E., Lattard, V., 2017. Core-shell LC-MS/MS method for quantification of second generation anticoagulant rodenticides diastereoisomers in rat liver in relationship with exposure of wild rats. *J. Chromatogr. B* 1041–1042, 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.028>
- Fournier-Chambrillon, C., Berny, P.J., Coiffier, O., Barbedienne, P., Dassé, B., Delas, G., Galineau, H., Mazet, A., Pouzenc, P., Rosoux, R., Fournier, P., 2004. Evidence of secondary poisoning of

- free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implications for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *J. Wildl. Dis.* 40, 688–695. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.688>
- Frankova, M., Stejskal, V., Aulicky, R., 2019. Efficacy of rodenticide baits with decreased concentrations of brodifacoum: Validation of the impact of the new EU anticoagulant regulation. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53299-8>
- Fraser, J.D., Price, P.A., 1988. 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.* 263, 11033–11036.
- Furie, B., Bouchard, B.A., Furie, B.C., 1999. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 93, 1798–1808.
- Geduhn, A., Jacob, J., Schenke, D., Keller, B., Kleinschmidt, S., Esther, A., 2015. Relation between Intensity of Biocide Practice and Residues of Anticoagulant Rodenticides in Red Foxes (*Vulpes vulpes*). *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139191>
- Giraudoux, P., Coeurdassier, M., Couval, G., Jacquot, M., Renaude, R., Truchetet, D., Raoul, F., 2012. Sustainable control of grassland small mammals.
- Giraudoux, P., Tremollières, C., Barbier, B., Defaut, R., Rieffel, D., Bernard, N., Lucot, É., Berny, P., 2006. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environ. Res.* 102, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.02.008>
- Gómez-Ramírez, P., Shore, R.F., van den Brink, N.W., van Hattum, B., Bustnes, J.O., Duke, G., Fritsch, C., García-Fernández, A.J., Helander, B.O., Jaspers, V., Krone, O., Martínez-López, E., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., 2014. An overview of existing raptor contaminant monitoring activities in Europe. *Environ. Int.* 67, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.004>
- Gong, X., Gutala, R., Jaiswal, A.K., 2008. Quinone Oxidoreductases and Vitamin K Metabolism, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 85–101. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)00005-2)
- Goulois, J., Chapuzet, A., Lambert, V., Chatron, N., Tchertanov, L., Legros, L., Benoît, E., Lattard, V., 2016. 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.* 72, 544–550. <https://doi.org/10.1002/ps.4020>
- Goulois, J., Lambert, V., Legros, L., Benoit, E., Lattard, V., 2017. Adaptive evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides. *Ecol. Evol.* 7, 2767–2776. <https://doi.org/10.1002/ece3.2829>
- Grandemange, A., Lasseur, R., Longin-Sauvageon, C., Benoit, E., Berny, P., 2010. Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manag. Sci.* 66, 270–276. <https://doi.org/10.1002/ps.1869>
- Greaves, J.H., 1994. Resistance to anticoagulant rodenticides., in: *Rodent Pests and Their Control*, CAB International. Buckle, A.P., Smith, R.H., Wallingford, Oxon, UK, pp. 197–217.
- Griggs, A.N., Allbaugh, R.A., Tofflemire, K.L., Ben-Shlomo, G., Whitley, D., Paulsen, M.E., 2016. Anticoagulant rodenticide toxicity in six dogs presenting for ocular disease. *Vet. Ophthalmol.* 19, 73–80. <https://doi.org/10.1111/vop.12267>
- Guddorf V, Kummerfeld N, Mischke R, 2014. BMTW- Methodical aspects of blood coagulation measurements in birds applying commercial reagents – a pilot study. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 322–327. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-127-322>
- Hammed, A., 2013. Résistance de cible aux antivitamines K : Analyses des conséquences catalytiques de différentes mutations de VKORC1 et étude du rôle d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22048.58881>
- Hammed, A., Matagrín, B., Spohn, G., Prouillac, C., Benoit, E., Lattard, V., 2013. VKORC1L1, an Enzyme Rescuing the Vitamin K 2,3-Epoxy Reductase Activity in Some Extrahepatic Tissues during Anticoagulation Therapy. *J. Biol. Chem.* 288, 28733–28742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457119>

- Heemskerk, J.W.M., Bevers, E.M., Lindhout, T., 2002. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb. Haemost.* 88, 186–193.
- Hellemsans, J., Vorlat, M., Verstraete, M., 1963. Survival Time of Prothrombin and Factors VII, IX and X after Completely Synthesis Blocking Doses of Coumarin Derivatives. *Br. J. Haematol.* 9, 506–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1963.tb05475.x>
- Hill, H.S., Grams, J., Walton, R.G., Liu, J., Moellering, D.R., Garvey, W.T., 2014. Carboxylated and Uncarboxylated Forms of Osteocalcin Directly Modulate the Glucose Transport System and Inflammation in Adipocytes. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* 46, 341–347. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368709>
- Hindmarch, S., Elliott, J.E., 2018. Ecological Factors Driving Uptake of Anticoagulant Rodenticides in Predators, in: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife, Emerging Topics in Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 229–258. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9_9
- Hindmarch, S., Rattner, B.A., Elliott, J.E., 2019. Use of blood clotting assays to assess potential anticoagulant rodenticide exposure and effects in free-ranging birds of prey. *Sci. Total Environ.* 657, 1205–1216. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.485>
- Hirota, Y., Nakagawa, K., Sawada, N., Okuda, N., Suhara, Y., Uchino, Y., Kimoto, T., Funahashi, N., Kamao, M., Tsugawa, N., Okano, T., 2015. Functional Characterization of the Vitamin K2 Biosynthetic Enzyme UBIAD1. *PLOS ONE* 10, e0125737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125737>
- Hirota, Y., Tsugawa, N., Nakagawa, K., Suhara, Y., Tanaka, K., Uchino, Y., Takeuchi, A., Sawada, N., Kamao, M., Wada, A., Okitsu, T., Okano, T., 2013. Menadiolone (vitamin K3) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K2) in rats. *J. Biol. Chem.* 288, 33071–33080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.477356>
- Hodroge, A., Longin-Sauvageon, C., Fourel, I., Benoit, E., Lattard, V., 2011. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch. Biochem. Biophys.* 515, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.08.010>
- Horak, K.E., Campton, C.M., Volker, S.F., 2020. Are reports of reduced field efficacy of diphacinone and chlorofacinone in California ground squirrels (*Otospermophilus beecheyi*) due to elevated rodenticide metabolism? *Crop Prot.* 127, 104969. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104969>
- Huckle, K.R., Hutson, D.H., Logan, C.J., Morrison, B.J., Warburton, P.A., 1989. The fate of the rodenticide flocoumafen in the rat: Retention and elimination of a single oral dose. *Pestic. Sci.* 25, 297–312. <https://doi.org/10.1002/ps.2780250310>
- Huckle, K.R., Hutson, D.H., Warburton, P.A., 1988. Elimination and Accumulation of the Rodenticide Flocoumafen in Rats Following Repeated Oral Administration. *Xenobiotica* 18, 1465–1479. <https://doi.org/10.3109/00498258809042269>
- Hunt, W.G., Wiens, J.D., Law, P.R., Fuller, M.R., Hunt, T.L., Driscoll, D.E., Jackman, R.E., 2017. Quantifying the demographic cost of human-related mortality to a raptor population. *PLOS ONE* 12, e0172232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172232>
- Hwang, Y.-C., Jeong, I.-K., Ahn, K.J., Chung, H.Y., 2009. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced β -cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25, 768–772. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1045>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2000. Some antiviral and antineoplastic drugs, and other pharmaceutical agents. (No. Vol. 76), IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Ingram, B.O., Turbyfill, J.L., Bledsoe, P.J., Jaiswal, A.K., Stafford, D.W., 2013. 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.* 456, 47–54. <https://doi.org/10.1042/BJ20130639>
- Ishizuka, M., Okajima, F., Tanikawa, T., Min, H., Tanaka, K.D., Sakamoto, K.Q., Fujita, S., 2007. Elevated Warfarin Metabolism in Warfarin-Resistant Roof Rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab. Dispos.* 35, 62–66. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.011775>
- Jacquot, M., Coeurdassier, M., Sage, M., Fourel, I., Dinkel, A., Parmentier, A.-L., Dervaux, A., Rieffel, D., Prat-Mairey, Y., Raoul, F., Giraudoux, P., 2013. Linking predator exposure and patterns of treatments with anticoagulant rodenticides by using faeces, in: 9th European Vertebrate Pest Management Conference. Turku, Finland.
- Jenkins, A.R., Smallie, J.J., Diamond, M., 2010. Avian collisions with power lines: A global review of causes and mitigation with a South African perspective. *Bird Conserv. Int.* 20, 263–278. <https://doi.org/10.1017/S0959270910000122>
- Jørgensen, S.E., Fath, B.D., Elsevier Science (Firm), 2008. *Encyclopedia of ecology*. Elsevier, Oxford.
- Kamil, N., 1987. Kinetics of bromadiolone, anticoagulant rodenticide, in the norway rat (*Rattus norvegicus*). *Pharmacol. Res. Commun.* 19, 767–775. [https://doi.org/10.1016/0031-6989\(87\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0031-6989(87)90011-7)
- Kataranovski, M., Mirkov, I., Vrankovic, J., Kataranovski, D., Subota, V., 2008. Percutaneous toxicity of anticoagulant warfarin in rats. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 27, 29–40. <https://doi.org/10.1080/15569520701860999>
- Kindberg, C.G., Suttie, J.W., 1989. Effect of Various Intakes of Phylloquinone on Signs of Vitamin K Deficiency and Serum and Liver Phylloquinone Concentrations in the Rat. *J. Nutr.* 119, 175–180. <https://doi.org/10.1093/jn/119.2.175>
- Knopper, L.D., Mineau, P., Walker, L.A., Shore, R.F., 2007. Bone Density and Breaking Strength in UK Raptors Exposed to Second Generation Anticoagulant Rodenticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78, 249–251. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9122-x>
- Koivu-Tikkanen, T.J., Schurgers, L.J., Thijssen, H.H.W., Vermeer, C., 2000. Intestinal, hepatic, and circulating vitamin K levels at low and high intakes of vitamin K in rats. *Br. J. Nutr.* 83, 185–190. <https://doi.org/10.1017/S0007114500000234>
- Koos, R., Mahnken, A.H., Mühlenbruch, G., Brandenburg, V., Pflueger, B., Wildberger, J.E., Kühn, H.P., 2005. Relation of Oral Anticoagulation to Cardiac Valvular and Coronary Calcium Assessed by Multislice Spiral Computed Tomography. *Am. J. Cardiol.* 96, 747–749. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.05.014>
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., Aster, J., 2010. Hemodynamic disorders, thromboembolic disease and shock, in: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th Ed. Philadelphia, PA, pp. 118–20.
- Laas, F.J., Forss, D.A., Godfreyi, M.E.R., 1985. Retention of brodifacoum in sheep tissues and excretion in faeces. *N. Z. J. Agric. Res.* 28, 357–359. <https://doi.org/10.1080/00288233.1985.10430438>
- Labuschagne, L., Swanepoel, L.H., Taylor, P.J., Belmain, S.R., Keith, M., 2016. Are avian predators effective biological control agents for rodent pest management in agricultural systems? *Biol. Control* 101, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.003>
- Lalkhen, A.G., McCluskey, A., 2008. Clinical tests: sensitivity and specificity. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain* 8, 221–223. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkn041>
- Langford, K.H., Reid, M., Thomas, K.V., 2013. The occurrence of second generation anticoagulant rodenticides in non-target raptor species in Norway. *Sci. Total Environ.* 450–451, 205–208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.100>
- Lasne, D., Jude, B., Susen, S., 2006. From normal to pathological hemostasis. *Can. J. Anesth. Can. Anesth.* 53, S2–S11. <https://doi.org/10.1007/BF03022247>
- Lefebvre, S., Benoit, E., Lattard, V., 2016a. Comparative Biology of the Resistance to Vitamin K Antagonists: An Overview of the Resistance Mechanisms, in: Basaran, O., Biteker, M. (Eds.), *Anticoagulation Therapy*. InTech, France. <https://doi.org/10.5772/64204>

- Lefebvre, S., Fourel, I., Chatron, N., Caruel, H., Benoit, E., Lattard, V., 2020. Comparative biological properties of the four stereoisomers of difethialone, a second-generation anticoagulant rodenticide, in rats: development of a model allowing to choose the appropriate stereoisomeric ratio. *Arch. Toxicol.* 94, 795–801. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02662-0>
- Lefebvre, S., Fourel, I., Queffélec, S., Vodovar, D., Mégarbane, B., Benoit, E., Siguret, V., Lattard, V., 2017. Poisoning by Anticoagulant Rodenticides in Humans and Animals: Causes and Consequences, in: Malangu, N. (Ed.), *Poisoning - From Specific Toxic Agents to Novel Rapid and Simplified Techniques for Analysis*. InTech, France. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69955>
- Lefebvre, S., Rannou, B., Besse, S., Benoit, E., Lattard, V., 2016b. Origin of the gender differences of the natural resistance to antivitamin K anticoagulants in rats. *Toxicology* 344–346, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.02.002>
- Link, K.P., 1959. The Discovery of Dicumarol and Its Sequels. *Circulation* 19, 97–107. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.19.1.97>
- Lohr, M.T., Davis, R.A., 2018. Anticoagulant rodenticide use, non-target impacts and regulation: A case study from Australia. *Sci. Total Environ.* 634, 1372–1384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.069>
- López-Barea, J., 1995. Biomarkers in Ecotoxicology: an Overview, in: Degen, G.H., Seiler, J.P., Bentley, P. (Eds.), *Toxicology in Transition*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 57–79. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79451-3_6
- López-Perea, J.J., Camarero, P.R., Sánchez-Barbudo, I.S., Mateo, R., 2019. Urbanization and cattle density are determinants in the exposure to anticoagulant rodenticides of non-target wildlife. *Environ. Pollut.* 244, 801–808. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.101>
- López-Perea, J.J., Mateo, R., 2018. Secondary Exposure to Anticoagulant Rodenticides and Effects on Predators, in: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife, Emerging Topics in Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 159–193. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9_7
- Mallick, P., Song, G., Efremenko, A.Y., Pendse, S.N., Creek, M.R., Osimitz, T.G., Hines, R.N., Hinderliter, P., Clewell, H.J., Lake, B.G., Yoon, M., Moreau, M., 2020. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Risk Assessment: Case Study With Pyrethroids. *Toxicol. Sci.* 176, 460–469. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa070>
- Markussen, M.D., Heiberg, A.-C., Fredholm, M., Kristensen, M., 2008. Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: a possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance. *Pest Manag. Sci.* 64, 239–248. <https://doi.org/10.1002/ps.1506>
- Marquez, A., Khalil, R.A., Fourel, I., Ovarbury, T., Pinot, A., Rosine, A., Thalmensi, G., Jaffory, G., Kodjo, A., Benoit, E., Lattard, V., 2019. Resistance to anticoagulant rodenticides in Martinique could lead to inefficient rodent control in a context of endemic leptospirosis. *Sci. Rep.* 9, 13491. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49661-5>
- Martin, G., Sutherland, R., Robertson, I., Kirkpatrick, W., King, D., Hood, P., 1991. Assessment of the potential toxicity of a poison for rabbits, pindone (2-pivalyl 1, 3 indandione), to domestic animals. *Aust. Vet. J.* 68, 241–243. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03217.x>
- McGee, C.F., McGilloway, D.A., Buckle, A.P., 2020. Anticoagulant rodenticides and resistance development in rodent pest species – A comprehensive review. *J. Stored Prod. Res.* 88, 101688. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101688>
- Meerburg, B.G., Singleton, G.R., Kijlstra, A., 2009a. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 221–270. <https://doi.org/10.1080/10408410902989837>
- Meerburg, B.G., Singleton, G.R., Leirs, H., 2009b. The Year of the Rat ends - time to fight hunger! *Pest Manag. Sci.* 65, 351–352. <https://doi.org/10.1002/ps.1718>
- Millot, F., Decors, A., Mastain, O., Quintaine, T., Berny, P., Vey, D., Lasseur, R., Bro, E., 2017. Field evidence of bird poisonings by imidacloprid-treated seeds: a review of incidents reported by

- the French SAGIR network from 1995 to 2014. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 5469–5485. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8272-y>
- Mineau, P., Collins, B.T., Baril, A., 1996. On the Use of Scaling Factors to Improve Interspecies Extrapolation of Acute Toxicity in Birds. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 24, 24–29. <https://doi.org/10.1006/rtph.1996.0061>
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2007. Avis aux fabricants, distributeurs et utilisateurs de produits phytopharmaceutiques concernant la non-inscription de certaines substances actives à l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil et le retrait des autorisations de produits phytopharmaceutiques contenant ces substances, *Journal Officiel de la République Française*.
- Mitchell, D., Kirschbaum, E.H., Perry, R.L., 1975. Effects of neophobia and habituation on the poison-induced avoidance of exteroceptive stimuli in the rat. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 1, 47–55.
- Mole, R.H., 1948. Fibrinolysin and the fluidity of the bloodpost mortem. *J. Pathol. Bacteriol.* 60, 413–427. <https://doi.org/10.1002/path.1700600308>
- Mooney, J., Lynch, M.R., Prescott, C.V., Clegg, T., Loughlin, M., Hannon, B., Moore, C., Faulkner, R., 2018. VKORC1 sequence variants associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Irish populations of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus*. *Sci. Rep.* 8, 4535. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22815-7>
- Mount, M.E., Kass, P.H., 1989. Diagnostic importance of vitamin K1 and its epoxide measured in serum of dogs exposed to an anticoagulant rodenticide. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1704–1709.
- Murphy, M.J., 2012. Anticoagulant rodenticides, in: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, Ramesh C. Gupta. Academic Press, pp. 673–697.
- Murphy, M.J., 2002. Rodenticides. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 32, 469–484. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)00003-1)
- Murray, M., 2018. Ante-mortem and Post-mortem Signs of Anticoagulant Rodenticide Toxicosis in Birds of Prey, in: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Springer International Publishing, Cham, pp. 109–134. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9_5
- Murray, M., 2017. Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in four species of birds of prey in Massachusetts, USA, 2012–2016, in relation to use of rodenticides by pest management professionals. *Ecotoxicology* 26, 1041–1050. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1832-1>
- Murray, M., 2011. Anticoagulant Rodenticide Exposure and Toxicosis in Four Species of Birds of Prey Presented to a Wildlife Clinic in Massachusetts, 2006–2010. *J. Zoo Wildl. Med.* 42, 88–97. <https://doi.org/10.1638/2010-0188.1>
- Nakagawa, K., Hirota, Y., Sawada, N., Yuge, N., Watanabe, M., Uchino, Y., Okuda, N., Shimomura, Y., Suhara, Y., Okano, T., 2010. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* 468, 117–121. <https://doi.org/10.1038/nature09464>
- Nakagawa, L., de Masi, E., Narciso, E., Neto, H.M., Papini, S., 2015. Palatability and efficacy of bromadiolone rodenticide block bait previously exposed to environmental conditions. *Pest Manag. Sci.* 71, 1414–1418. <https://doi.org/10.1002/ps.3944>
- Nakayama, S.M.M., Morita, A., Ikenaka, Y., Mizukawa, H., Ishizuka, M., 2019. A review: poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally. *J. Vet. Med. Sci.* 81, 298–313. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0717>
- Newton, I. (Ian), Shore, R.F. (Richard), Wyllie, I. (Ian), Birks, J.D.S., Dale, L., 1999. Empirical evidence of side-effects of rodenticides on some predatory birds and mammals.
- Newton, I., Wyllie, I., Freestone, P., 1990. Rodenticides in British Barn Owls. *Environ. Pollut.* 68, 101–117. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(90\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90015-5)
- Niedringhaus, K.D., Nemeth, N.M., Gibbs, S., Zimmerman, J., Shender, L., Slankard, K., Fenton, H., Charlie, B., Dalton, M.F., Elsmo, E.J., Poppenga, R., Millsap, B., Ruder, M.G., 2021. Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*)

- and golden eagles (*Aquila chrysaetos*) in the United States. *PLOS ONE* 16, e0246134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246134>
- O'Bryan, S.M., Constable, D.J.C., 1991. Quantification of Brodifacoum in Plasma and Liver Tissue by HPLC. *J. Anal. Toxicol.* 15, 144–147. <https://doi.org/10.1093/jat/15.3.144>
- O'Reilly, R.A., Aggeler, P.M., 1968. Studies on Coumarin Anticoagulant Drugs: Initiation of Warfarin Therapy Without a Loading Dose. *Circulation* 38, 169–177. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.38.1.169>
- Palta, S., Saroa, R., Palta, A., 2014. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58, 515–523. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643>
- Parshad, V.R., Kochar, J.K., 1995. Potential of three rodenticides to induce conditioned aversion to their baits in the Indian mole rat, *Bandicota bengalensis*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 45, 267–276. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)99372-G](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)99372-G)
- Pelz, H.-J., Rost, S., Hünerberg, M., Fregin, A., Heiberg, A.-C., Baert, K., MacNicoll, A.D., Prescott, C.V., Walker, A.-S., Oldenburg, J., Müller, C.R., 2005. The Genetic Basis of Resistance to Anticoagulants in Rodents. *Genetics* 170, 1839–1847. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.040360>
- Petterino, C., Paolo, B., Tristo, G., 2004. Clinical and pathological features of anticoagulant rodenticide intoxications in dogs. *Vet. Hum. Toxicol.* 46, 70–75.
- Pitt, W.C., Higashi, M., Primus, T.M., 2011. The effect of cooking on diphacinone residues related to human consumption of feral pig tissues. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2030–2034. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.014>
- Poché, R.M., 1988. Rodent tissue residue and secondary hazard studies with bromadiolone. *EPPO Bull.* 18, 323–330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1988.tb00382.x>
- Porte-Visa, C., van den Brink, N., van der Oost, R., 2005. Biomarkers in environmental assessment, in: Munawar, M., den Besten, P. (Eds.), *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems*. CRC Press, pp. 87–152. <https://doi.org/10.1201/9781420037500.ch3>
- Price, P.A., Faus, S.A., Williamson, M.K., 1998. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1400–1407.
- Price, P.A., Urist, M.R., Otawara, Y., 1983. Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 765–771. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91663-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91663-7)
- Quéré, J.P., Le Louarn, H., 2011. *Les rongeurs en France. Faunistique et biologie*. Editions Quae, Versailles.
- Quy, R.J., Cowan, D.P., Prescott, C.V., Gill, J.E., Kerins, G.M., Dunsford, G., Jones, A., Macnicoll, A.D., 1995. Control of a population of norway rats resistant to anticoagulant rodenticides. *Pestic. Sci.* 45, 247–256. <https://doi.org/10.1002/ps.2780450308>
- Rached, A., Moriceau, M.-A., Serfaty, X., Lefebvre, S., Lattard, V., 2020. Biomarkers Potency to Monitor Non-target Fauna Poisoning by Anticoagulant Rodenticides. *Front. Vet. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.616276>
- Rattner, B., A., Lazarus, R., S., Bean, T., G., Horak, K., E., Volker, S., F., Lankton, J., 2018. Is Sensitivity to Anticoagulant Rodenticides Affected by Repeated Exposure in Hawks? *Proc. Vertebr. Pest Conf.* 28. <https://doi.org/10.5070/V42811045>
- Rattner, B.A., Harvey, J.J., 2021. Challenges in the interpretation of anticoagulant rodenticide residues and toxicity in predatory and scavenging birds. *Pest Manag. Sci.* 77, 604–610. <https://doi.org/10.1002/ps.6137>
- Rattner, B.A., Horak, K.E., Lazarus, R.S., Eisenreich, K.M., Meteyer, C.U., Volker, S.F., Campton, C.M., Eisemann, J.D., Johnston, J.J., 2012. Assessment of toxicity and potential risk of the anticoagulant rodenticide diphacinone using Eastern screech-owls (*Megascops asio*). *Ecotoxicology* 21, 832–846. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0844-5>
- Rattner, B.A., Horak, K.E., Lazarus, R.S., Goldade, D.A., Johnston, J.J., 2014a. Toxicokinetics and coagulopathy threshold of the rodenticide diphacinone in eastern screech-owls (*Megascops asio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 74–81. <https://doi.org/10.1002/etc.2390>

- Rattner, B.A., Horak, K.E., Warner, S.E., Day, D.D., Meteyer, C.U., Volker, S.F., Eisemann, J.D., Johnston, J.J., 2011. Acute toxicity, histopathology, and coagulopathy in American kestrels (*Falco sparverius*) following administration of the rodenticide diphacinone. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1213–1222. <https://doi.org/10.1002/etc.490>
- Rattner, B.A., Horak, K.E., Warner, S.E., Johnston, J.J., 2010. Acute toxicity of diphacinone in Northern bobwhite: Effects on survival and blood clotting. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1159–1164. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.021>
- Rattner, B.A., Lazarus, R.S., Elliott, J.E., Shore, R.F., van den Brink, N., 2014b. Adverse Outcome Pathway and Risks of Anticoagulant Rodenticides to Predatory Wildlife. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8433–8445. <https://doi.org/10.1021/es501740n>
- Rattner, B.A., Mastrota, F.N., 2018. Anticoagulant Rodenticide Toxicity to Non-target Wildlife Under Controlled Exposure Conditions, in: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife, Emerging Topics in Ecotoxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 45–86. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64377-9_3
- Rattner, B.A., Volker, S.F., Lankton, J.S., Bean, T.G., Lazarus, R.S., Horak, K.E., 2020. Brodifacoum Toxicity in American Kestrels (*Falco sparverius*) with Evidence of Increased Hazard on Subsequent Anticoagulant Rodenticide Exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 39, 468–481. <https://doi.org/10.1002/etc.4629>
- Rodenticide resistance Action Committee of CropLife International (RRAC), 2003. A reappraisal of blood clotting response tests for anticoagulant resistance and proposal for a standardised BCR test methodology (No. RRAC Technical Monograph).
- Ronden, J.E., Driittij-Reijnders, M.J., Vermeer, C., Thijssen, H.H., 1998a. Intestinal flora is not an intermediate in the phyloquinone-menaquinone-4 conversion in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 69–75. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(97\)00089-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00089-5)
- Ronden, J.E., Thijssen, H.H., Vermeer, C., 1998b. Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 16–22. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(97\)00075-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00075-5)
- Ross, S.G., Bolliger, S.A., Ampanozi, G., Oesterhelweg, L., Thali, M.J., Flach, P.M., 2014. Postmortem CT Angiography: Capabilities and Limitations in Traumatic and Natural Causes of Death. *RadioGraphics* 34, 830–846. <https://doi.org/10.1148/rg.343115169>
- Rost, S., Pelz, H.-J., Menzel, S., MacNicoll, A.D., León, V., Song, K.-J., Jäkel, T., Oldenburg, J., Müller, C.R., 2009. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet.* 9.
- Rozanski, E.A., Drobatz, K.J., Hugher, D., Scotti, M., Giger, U., 1999. Thrombotest (PIVKA) Test Results in 25 Dogs with Acquired and Hereditary Coagulopathies. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 9, 73–78. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.1999.tb00072.x>
- Rutty, G.N., Woolley, A., Brookfield, C., Shepherd, F., Kitchen, S., 2003. The PIVKA II test: The first reliable coagulation test for autopsy investigations. *Int. J. Legal Med.* 117, 143–148. <https://doi.org/10.1007/s00414-003-0362-y>
- Sage, M., Cœurdassier, M., Defaut, R., Éric Lucot, Barbier, B., Rieffel, D., Berny, P., Giraudoux, P., 2007. How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*? *Environ. Pollut.* 148, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.09.019>
- Sage, M., Courdassier, M., Defaut, R., Gimbert, F., Berny, P., Giraudoux, P., 2008. Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of the water vole, *Arvicola terrestris*. *Sci. Total Environ.* 407, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.09.003>
- Sage, M., Fourel, I., Cœurdassier, M., Barrat, J., Berny, P., Giraudoux, P., 2010. Determination of bromadiolone residues in fox faeces by LC/ESI-MS in relationship with toxicological data and clinical signs after repeated exposure. *Environ. Res.* 110, 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.07.009>

- Saitta, C., Raffa, G., Alibrandi, A., Brancatelli, S., Lombardo, D., Tripodi, G., Raimondo, G., Pollicino, T., 2017. PIVKA-II is a useful tool for diagnostic characterization of ultrasound-detected liver nodules in cirrhotic patients. *Medicine (Baltimore)* 96, e7266. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007266>
- Sánchez-Barbudo, I.S., Camarero, P.R., Mateo, R., 2012. Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Sci. Total Environ.* 420, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.028>
- Schmidt, W., Beermann, D., Oesch, F., Jähnchen, E., 1979. Differential effect of the enantiomers of phenprocoumon and warfarin on the vitamin K1-epoxide/vitamin K1 ratio in rat plasma. *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 490–491. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1979.tb13567.x>
- Schofield, F.W., 1984. A Brief Account of a Disease in Cattle Simulating Hemorrhagic Septicaemia due to Feeding Sweet Clover. *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire Can.* 25, 453–455.
- Seljetun, K.O., Eliassen, E., Karinen, R., Moe, L., Vindenes, V., 2018. Quantitative method for analysis of six anticoagulant rodenticides in faeces, applied in a case with repeated samples from a dog. *Acta Vet. Scand.* 60, 3. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0357-9>
- Seljetun, K.O., Vindenes, V., Øiestad, E.L., Brochmann, G.-W., Eliassen, E., Moe, L., 2020. Determination of anticoagulant rodenticides in faeces of exposed dogs and in a healthy dog population. *Acta Vet. Scand.* 62, 30. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00531-5>
- Serieys, L.E.K., Lea, A.J., Epeldegui, M., Armenta, T.C., Moriarty, J., VandeWoude, S., Carver, S., Foley, J., Wayne, R.K., Riley, S.P.D., Uittenbogaart, C.H., 2018. Urbanization and anticoagulant poisons promote immune dysfunction in bobcats. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2533>
- Sheafor, S., Couto, C., 1999. Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 38–46. <https://doi.org/10.5326/15473317-35-1-38>
- Shearer, M.J., Fu, X., Booth, S.L., 2012. Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Adv. Nutr. Bethesda Md* 3, 182–195. <https://doi.org/10.3945/an.111.001800>
- Shearer, M.J., Newman, P., 2014. Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *J. Lipid Res.* 55, 345–362. <https://doi.org/10.1194/jlr.R045559>
- Silva, A.P., Viegas, C.S.B., Mendes, F., Macedo, A., Guilherme, P., Tavares, N., Dias, C., Rato, F., Santos, N., Faísca, M., Almeida, E. de, Neves, P.L., Simes, D.C., 2020. Gla-Rich Protein (GRP) as an Early and Novel Marker of Vascular Calcification and Kidney Dysfunction in Diabetic Patients with CKD: A Pilot Cross-Sectional Study. *J. Clin. Med.* 9, 635. <https://doi.org/10.3390/jcm9030635>
- Stone, W.B., Okoniewski, J.C., Stedelin, J.R., 1999. Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J. Wildl. Dis.* 35, 187–193. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.2.187>
- Suárez, O.V., Cueto, G.R., 2018. Comparison of efficacy of second-generation anticoagulant rodenticides: Effect of active ingredients, type of formulation and commercial suppliers. *Cogent Food Agric.* 4, 1525147. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1525147>
- Subota, V., Mirkov, I., Demenesku, J., Popov Aleksandrov, A., Ninkov, Mileusnic, D., Kataranovski, D., Kataranovski, M., 2015. Transdermal toxicity of topically applied anticoagulant rodenticide warfarin in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 41, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.12.006>
- Sugano, S., Kobayashi, T., Tanikawa, T., Kawakami, Y., Kojima, H., Nakamura, K., Uchida, A., Morishima, N., Tamai, Y., 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* 31, 399–407. <https://doi.org/10.1080/00498250110060932>
- Taggart, W.V., Matschiner, J.T., 1969. Metabolism of menadione-6,7-3H. *Biochemistry* 8, 1141–1146. <https://doi.org/10.1021/bi00831a047>

- Takeda, K., Ikenaka, Y., Tanaka, K.D., Nakayama, S.M.M., Tanikawa, T., Mizukawa, H., Ishizuka, M., 2018. Investigation of hepatic warfarin metabolism activity in rodenticide-resistant black rats (*Rattus rattus*) in Tokyo by in situ liver perfusion. *Pestic. Biochem. Physiol.* 148, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.018>
- Tanaka, K.D., Kawai, Y.K., Ikenaka, Y., Harunari, T., Tanikawa, T., Ando, S., Min, H. won, Okajima, F., Fujita, S., Ishizuka, M., 2012. The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. *Pestic. Biochem. Physiol.* 103, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.04.011>
- Taylor, M.J., Nevison, I., Casali, F., Giergiel, M., Giela, A., Campbell, S., Sharp, E.A., Hartley, G., Posyniak, A., 2020. Investigation of the distribution of anticoagulant rodenticide residues in red fox (*Vulpes vulpes*) livers to ensure optimum sampling protocol. *Environ. Chem. Ecotoxicol.* 2, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2020.04.001>
- Thijssen, H.H.W., Driittij-Reijnders, M.J., 1994. Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *Br. J. Nutr.* 72, 415–425. <https://doi.org/10.1079/BJN19940043>
- Thijssen, H.H.W., Driittij-Reijnders, M.J., Fischer, M.A.J.G., 1996. Phylloquinone and Menaquinone-4 Distribution in Rats: Synthesis rather than Uptake Determines Menaquinone-4 Organ Concentrations. *J. Nutr.* 126, 537–543. <https://doi.org/10.1093/jn/126.2.537>
- Thomas, P.J., Mineau, P., Shore, R.F., Champoux, L., Martin, P.A., Wilson, L.K., Fitzgerald, G., Elliott, J.E., 2011. Second generation anticoagulant rodenticides in predatory birds: Probabilistic characterisation of toxic liver concentrations and implications for predatory bird populations in Canada. *Environ. Int.* 37, 914–920. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.010>
- Thompson, R.D., Mitchell, G.C., Burns, R.J., 1972. Vampire Bat Control by Systemic Treatment of Livestock with an Anticoagulant. *Science* 177, 806–808. <https://doi.org/10.1126/science.177.4051.806>
- Thomson, A.E., Squires, E.J., Gentry, P.A., 2002. Assessment of factor V, VII and X activities, the key coagulant proteins of the tissue factor pathway in poultry plasma. *Br. Poult. Sci.* 43, 313–321.
- Tie, J.-K., Stafford, D.W., 2016. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J. Thromb. Haemost.* 14, 236–247. <https://doi.org/10.1111/jth.13217>
- Tosh, D.G., McDonald, R.A., Bearhop, S., Llewellyn, N.R., Ian Montgomery, W., Shore, R.F., 2012. Rodenticide exposure in wood mouse and house mouse populations on farms and potential secondary risk to predators. *Ecotoxicology* 21, 1325–1332. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0886-3>
- Triplett, D.A., Harms, C.S., 1981a. Coagulation Screening Assays : Prothrombin Time, in: *Procedures for the Coagulation Laboratory*. Chicago, pp. 12–14.
- Triplett, D.A., Harms, C.S., 1981b. Coagulation Screening Assays : Activated Partial Thromboplastin Time, in: *Procedures for the Coagulation Laboratory*. Chicago, pp. 6–9.
- Triplett, D.A., Harms, C.S., 1981c. Coagulation Screening Assays : Thrombin Time, in: *Procedures for the Coagulation Laboratory*. Chicago, pp. 20–21.
- Triplett, D.A., Harms, C.S., 1981d. Coagulation Screening Assays : Russel’s Viper Venom Time, in: *Procedures for the Coagulation Laboratory*. Chicago, pp. 15–17.
- United States Environmental Protection Agency, 2008. Risk mitigation decision for ten rodenticides.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2011. Risks of Non-Compliant Rodenticides to Nontarget Wildlife - Background Paper for Scientific Advisory Panel on Notice of Intent to Cancel Non-RMD Compliant Rodenticide Products (No. EPA-HQ-OPP-2011-0718-0006).
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Viegas, C.S.B., Rafael, M.S., Enriquez, J.L., Teixeira, A., Vitorino, R., Luís, I.M., Costa, R.M., Santos, S., Cavaco, S., Neves, J., Macedo, A.L., Willems, B.A.G., Vermeer, C., Simes, D.C., 2015. Gla-Rich Protein Acts as a Calcification Inhibitor in the Human Cardiovascular System. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 399–408. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304823>

- Waddell, L.S., Poppenga, R.H., Drobatz, K.J., 2013. Anticoagulant rodenticide screening in dogs: 123 cases (1996–2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242, 516–521. <https://doi.org/10.2460/javma.242.4.516>
- Walker, L.A., Turk, A., Long, S.M., Wienburg, C.L., Best, J., Shore, R.F., 2008. Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Sci. Total Environ.* 392, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.061>
- Watanabe, K.P., Saengtienchai, A., Tanaka, K.D., Ikenaka, Y., Ishizuka, M., 2010. Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 152, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.03.006>
- Watt, B.E., Proudfoot, A.T., Bradberry, S.M., Vale, J.A., 2005. Anticoagulant Rodenticides: Toxicol. Rev. 24, 259–269. <https://doi.org/10.2165/00139709-200524040-00005>
- Wei, F.-F., Trensou, S., Verhamme, P., Vermeer, C., Staessen, J.A., 2019. Vitamin K–Dependent Matrix Gla Protein as Multifaceted Protector of Vascular and Tissue Integrity. *Hypertension* 73, 1160–1169. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12412>
- Witmer, G.W., Shiels, A.B., 2017. Ecology, Impacts, and Management of Invasive Rodents in the United States, in: Pitt, W.C. (Ed.), *Ecology and Management of Terrestrial Vertebrate Invasive Species in the United States*. CRC Press, Boca Raton : Taylor & Francis, 2018. | “A CRC title, part of the Taylor & Francis imprint, a member of the Taylor & Francis Group, the academic division of T&F Informa plc.,” pp. 193–220. <https://doi.org/10.1201/9781315157078-10>
- Woodruff, T.J., 2011. Bridging epidemiology and model organisms to increase understanding of endocrine disrupting chemicals and human health effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.007>
- Woody, B.J., Murphy, M.J., Ray, Ai.C., Green, R.A., 1992. Coagulopathic Effects and Therapy of Brodifacoum Toxicosis in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 6, 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1992.tb00981.x>
- World Health Organisation, 2011. Leptospirosis: an emerging public health problem (No. 6), *Weekly Epidemiological Record*.
- Zebboudj, A.F., Shin, V., Boström, K., 2003. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J. Cell. Biochem.* 90, 756–765. <https://doi.org/10.1002/jcb.10669>
- Zoch, M.L., Clemens, T.L., Riddle, R.C., 2016. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 82, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.046>

VIII.ANNEXES

VIII.2. Résumé EVPMC 2019

Chlorophacinone exposure in milking ewes – residues in milk and human health issues.

Moriceau Meg-Anne (1,2), Sébastien Lefebvre, Isabelle Fourel, Etienne Benoit, Virginie Lattard (2)

1- CNITV, VetAgro Sup, 1 avenue Bourgelat, 69 280 Marcy-l'Étoile

cnitv@vetagro-sup.fr, 04 78 87 10 40

2- USC1233 RS2GP, INRA, VetAgro Sup, Univ Lyon, F69 280 Marcy-l'Étoile

Few data are available to characterize the risk of accidental exposure of dairy animals to widely used anticoagulant rodenticides (ARs), for the consumer of dairy products. Investigations concerning residues of chlorophacinone in milk of intoxicated dairy ewes were led to estimate the risk for human consumption. Twenty-three adult milking ewes accidentally ingested a whole bag of 20 kg of grain baits containing 50 mg/kg of chlorophacinone, *i.e.* 1 g of chlorophacinone in total. Milk samples were taken from the second day following the ingestion, in order to determine residues levels in milk and their toxicokinetics. Residues of chlorophacinone were detected in the milk of 13 animals (57%) at day 2, and remained quantifiable in 12 of these animals until day 6. For those animals, residue levels ranged from 0.40 to 11.50 ng/mL, with a mean value of 3.84 ng/mL, and decreased over time.

Those results demonstrate a mammary transfer of chlorophacinone. However residue levels are rather low even at Day 2 and decreasing quickly over time, with a mean calculated half-life of 2 days. Using safety factors already described in literature, even in the worst case scenario, human health concern related to the consumption of the milk of the dairy ewes used in this study seems low.

Anticoagulant rodenticide poisoning in lactating ewes: exploration of intoxication markers and human health dietary implications

Meg-Anne Moriceau (1,2), Sébastien Lefebvre (1), Isabelle Fourel (1), Etienne Benoit (1), Barnett A. Rattner (3), Virginie Lattard (1)

- 1- USC1233 RS2GP, INRA, VetAgro Sup, Univ Lyon, F69 280 Marcy-l'Étoile, FR
- 2- CNITV, VetAgro Sup, 1 avenue Bourgelat, 69 280 Marcy-l'Étoile, FR
- 3- U.S. Geological Survey, Patuxent Wildlife Research Center, Beltsville, MD 20705, USA

megannemoriceau@live.fr

Intense use of anticoagulant rodenticides in pest management can sometimes result in accidental exposure of domestic animals and wildlife, but relevant markers are scarce to differentiate life-threatening poisoning from insignificant exposure. When it comes to production animals, another issue is the level of residues in milk, eggs or meat from those exposed animals. Data from a flock of Lacaune ewes (n=23) accidentally exposed to a first-generation rodenticide, chlorophacinone, were used to explore the relevance of clinical and biological markers (prothrombin time, PT) in the assessment of the severity of exposure, as well as to determine pharmacokinetics of chlorophacinone in milk of those ewes in order to estimate the risk associated with its consumption. Three days after accidental ingestion, chlorophacinone was detected in plasma of 18 ewes, with concentrations exceeding 100 ng/mL in 11 animals, but none of them displayed clinical signs. Chlorophacinone was detected in milk on day 2 post-exposure and remained quantifiable for at least 7 days in milk of these 11 ewes. Concentrations in milk were much lower than in plasma and decreased quickly (mean half-life of 2 days). Variation in prothrombin time (PT) on Day 3 suggested that some of the ewes that ingested chlorophacinone may have been adversely affected, but PT did not facilitate estimation of the quantity of chlorophacinone consumed. This study showed that clinical signs or hematological markers may not be relevant to assess the severity of exposure in this ruminant species. It also demonstrated a dose-dependent mammary transfer of ingested chlorophacinone. Using safety factors described in the literature, human health concern related to the consumption of the milk from these dairy ewes seemed low.