

Liste des abréviations

ACT	Temps de coagulation activé
ACTA	Association de Coordination Technique Agricole
AVK	Antivitamine K
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CE₅₀	Concentration efficace médiane
CL₅₀	Concentration létale : concentration pour laquelle 50 % des animaux soumis au toxique meurent
DL₅₀	Dose létale : dose pour laquelle 50 % des animaux soumis au toxique meurent
EPPO	European Plant Protection Organization
FNS	Formule de numération sanguine
GB	Globules blancs
GR	Globules rouges
Gr	Granulocytes
Hb	Hémoglobine
Ht	Hématocrites
Lipha	Société Lyonnaise industrielle pharmaceutique
LY	Lymphocytes
MO	Monocytes
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PCO	Pest Control Operators
PDF	Produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène
PLT	Plaquettes
Pm	Poids moléculaire
PPSB	Prothrombine, Proconvertine, Facteur de Stuart et facteur anti-hémophilique B

SGARs	Second generation anticoagulants rodenticides
TCA	Temps de l'activé céphaline
TCMH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
TP	Taux de prothrombine
TQ	Temps de Quick
USEPA	US Environmental Protection Agency
VGM	Volume globulaire moyen des hématies

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales zoonoses transmises par les rongeurs	8
Tableau 2 : Structures du Coumafène et de la Bromadiolone	11
Tableau 3 : Principales caractéristiques du Coumafène et de la Bromadiolone	12
Tableau 4 : Principales caractéristiques physico-chimiques de la Chlorophacinone	13
Tableau 5 : Familles et générations de raticides anticoagulants	16
Tableau 6 : Toxicité des principaux anticoagulants pour différentes espèces (DL ₅₀ en mg/kg)	17
Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques des principaux raticides anticoagulants	18
Tableau 8 : Conditions d'activation et d'inhibition des enzymes participant à la régénération de la vitamine K réduite	39
Tableau 9 : Toxicité aigüe (DL ₅₀ mg/kg) du Brodifacoum chez les rats	45
Tableau 10 : Persistance des raticides anticoagulants de la première génération	47
Tableau 11 : Persistance des raticides anticoagulants de la deuxième génération	48
Tableau 12 : Toxicité aigüe par voie orale (DL ₅₀ mg/kg) du Brodifacoum chez les mammifères	51
Tableau 13 : Toxicité aigüe par voie orale (DL ₅₀ mg/kg) du Brodifacoum pour les oiseaux	52
Tableau 14 : Variations des rapports organo-corporels (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins)	89
Tableau 15 : Variations du TP (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins)	96
Tableau 16 : Variations des paramètres hématologiques chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins)	98
Tableau 17 : Variations des paramètres biochimiques chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins)	105
Tableau 18 : Variations de la vitesse des spermatozoïdes chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapin)	111

Tableau 19 : Variations de la mobilité des spermatozoïdes chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins)	112
Tableau 20 : Variations de la concentration des spermatozoïdes chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins)	114
Tableau 21 : Variations de la vitalité (test d'éosine 1%) des spermatozoïdes chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins)	115
Tableau 22 : Variations de la vitalité (malformations) des spermatozoïdes chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins)	117

Liste des figures

Figure 1 : Présentation de la structure chimique de l'hydroxy-4-coumarine	10
Figure 2 : Formule développée du Coumafène	11
Figure 3 : Formule développée de la Chlorophacinone	12
Figure 4 : Structure chimique du Pindone	13
Figure 5 : Dérivés de l'hydroxy-4-benzothiopyranone	14
Figure 6 : Représentation théorique des cinétiques plasmatiques et hépatique des rodenticides anticoagulants chez le rat	22
Figure 7 : Représentation schématique du métabolisme des anticoagulants chez les rongeurs	25
Figure 8 : Schéma récapitulatif de la cascade de coagulation	30
Figure 9 : Hémostase secondaire	31
Figure 10 : Formule semi développée de la vitamine K ₁	33
Figure 11 : Régénération de la vitamine K ₁	36
Figure 12 : Cycle de la vitamine K ₁	38
Figure 13 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental	64
Figure 14 : Comptage de la concentration des spermatozoïdes dans la cellule de Malassez	81
Figure 15 : Coloration vitale (Eosine à 1 %) des spermatozoïdes	82
Figure 16 : Présentation schématique des modifications morphologiques des spermatozoïdes exposés à un stress hypo-osmotique	83
Figure 17 : Variations du poids corporel (g) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	87
Figure 18 : Variations du rapport hépato-somatique (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	90
Figure 19 : Variations du rapport spléno-somatique (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	90
Figure 20 : Variations du rapport cardio-somatique (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	91
Figure 21 : Variations du rapport gonado-somatique (testicule droit) (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	91
Figure 22 : Variations du rapport gonado-somatique (testicule gauche) (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	92

Figure 23 : Variations du poids relatif de l'épididyme droit (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	92
Figure 24 : Variations du poids relatif l'épididyme gauche (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	93
Figure 25 : Variations du rapport réno-somatique (rein droit) (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	93
Figure 26 : Variations du rapport réno-somatique (rein gauche) (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	94
Figure 27 : Variations du poids relatif de la surrénale droite (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	94
Figure 28 : Variations du poids relatif de la surrénale gauche (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	95
Figure 29 : Variations du TP (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	96
Figure 30 : Variation du nombre des globules blancs ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	99
Figure 31 : Variation du nombre des globules rouges ($10^6/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	99
Figure 32 : Variation du nombre d'hémoglobine (g/dL) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	100
Figure 33 : Variation du taux des hématocrites (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	100
Figure 34 : Variation du taux des plaquettes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	101
Figure 35 : Variation du nombre des lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	101
Figure 36 : Variation du nombre des monocytes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	102
Figure 37 : Variation du nombre des granulocytes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	102
Figure 38 : Variation du volume globulaire moyen (fl) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	103
Figure 39 : Variation du taux teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (pg) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	103

Figure 40 : Variation du taux de la CCMH (g/dL) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	104
Figure 41 : Variation de la glycémie (g/L) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	106
Figure 42 : Variation de la concentration sérique de l'urée (g/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	107
Figure 43 : Variation de la concentration sérique de la créatinine (mg/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	107
Figure 44 : Variation de la concentration sérique de l'acide urique (mg/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	108
Figure 45 : Variation de la concentration sérique du cholestérol (g/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	108
Figure 46 : Variation de la concentration sérique des triglycérides (g/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	109
Figure 47 : Variation de la calcémie (mg/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	109
Figure 48 : Variation de la concentration sérique du phosphore (g/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	110
Figure 49 : Variation de la vitesse des spermatozoïdes ($\mu\text{m/sec}$) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	111
Figure 50 : Variation de la mobilité des spermatozoïdes (%) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	113
Figure 51 : Variation de la vitesse des spermatozoïdes ($10^6/\text{mL}$) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	114
Figure 52 : Variation du taux de vitalité (test d'éosine 1%) des spermatozoïdes chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	116
Figure 53 : Variation du taux de vitalité (les malformations) des spermatozoïdes chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	118
Figure 54 : Coupes histologiques des testicules des lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	120
Figure 55 : Coupes histologiques hépatiques des lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement	122

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

RÉSUMÉS



Résumé

Les raticides anticoagulants sont le groupe de pesticides le plus utilisé pour le contrôle des rongeurs. Actuellement, ils sont représentés par la deuxième génération notamment le Brodifacoum qui est le raticide le plus utilisé, et donc responsable de nombreux accidents chez les humains et les animaux non-cibles. Cette étude vise à évaluer les effets toxiques du Brodifacoum chez le lapin mâle.

Nous avons utilisé 28 lapins mâles (*Cuniculus lepus*) divisés en 4 groupes sept lapins/chaque groupe. Le groupe 1 (G1) a servi de témoin, les groupes 2, 3 et 4 (G2, G3 et G4) ont été traités par le Brodifacoum à raison de 0,01, 0,02 et 0,04 mg/kg /j respectivement pendant 03 semaines.

Les résultats indiquent une diminution du poids corporel, aussi, une baisse significative du poids relatif des testicules et de l'épididyme. Cependant, une augmentation du poids relatif du foie, du cœur et de la rate a été enregistrée surtout chez le groupe traité par la plus forte dose comparé au groupe témoin. L'analyse des paramètres sanguins révèle des variations significatives chez les lapins traités par rapport aux témoins. Il nous paraît que le Brodifacoum a induit un déséquilibre métabolique des paramètres biochimiques étudiés. De même, une réduction significative des paramètres de la biologie des spermatozoïdes a été observée chez les lapins traités toujours comparés aux témoins. L'étude histologique a révélé des altérations tissulaires au niveau du foie et des testicules.

Nos résultats suggèrent le traitement des lapins par le Brodifacoum a probablement altérer les paramètres hématologiques, biochimiques et histologique, et il a peut être affecté la reproduction chez le lapin mâle.

Mots clés : raticide anticoagulant, Brodifacoum, hématologie, reproduction, lapin.

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

Abstract

Anticoagulant rodenticides are the largest group of pesticides used for control of harmful rodents. At present, they are represented by second generation rodenticides, particularly Brodifacoum, which is the most commonly employed and therefore responsible for numerous accidents involving humans and non-target animals. This study was focused on the evaluation of the toxic effect of Brodifacoum in male rabbits.

We used 28 male rabbits (*Cuniculus lepus*), divided into 4 groups of seven each. Group 1 (G1) served as control, groups 2, 3 and 4 (G2, G3 and G4) were treated by 0,01, 0,02 and 0,04 mg/kg/day of Brodifacoum, respectively during 03 weeks.

Results indicate a reduction in body weights, and a fall of testes and epididymis relative weights. However, an increase in liver, heart and spleen relative weights was recorded especially at the group treated by the highest dose compared to the control. The analysis of blood parameters reveals significant variations in treated rabbits compared to the control. It seems that the treatment by Brodifacoum induced a metabolic disorder illustrated by variations of various studied biochemical parameters rates. Similarly, a significant reduction of the parameters of spermatozoids biology was observed in treated rabbits compared with controls. The histological examination revealed structural deteriorations on liver and testes.

Our results suggest that the treatment of rabbits by Brodifacoum affects hematological, biochemical and histological parameters and consequently alters the reproduction.

Keywords: anticoagulant rodenticide, Brodifacoum, hematology, reproduction, rabbit.

الملخص

مبيدات القوارض المضادة للتخلر هي أكبر مجموعة من المبيدات المستخدمة لمكافحة القوارض الضارة. في الوقت الحاضر، تتمثل أغلبية هذه المبيدات في مبيدات القوارض المضادة للتخلر من الجيل الثاني، خاصة البروديفاكوم ، والذي يعتبر الأكثر استخداما ، وبالتالي المسؤول عن العديد من الحوادث عند الإنسان والحيوانات غير المستهدفة.

تهدف هذه الدراسة على تقييم التأثير السام للبروديفاكوم عند ذكور الأرانب ، لذا استخدمنا 28 من ذكور الأرانب (*Cuniculus lepus*) ، و التي قسمت الى 4 مجموعات تحتوي كل منها على سبعة أرانب.

المجموعة 1 (G1) مجموعة شاهدة ، وعولمت المجموعات 2 ، 3 و 4 (G2, G3 و G4) بجرعات:

0,01، 0,02، 0,04 ملغم/كغم/يوم من البروديفاكوم على التوالي خلال 03 أسابيع عن طريق الفم. أدت معاملة الأرانب بواسطة البروديفاكوم في انخفاض في وزن الجسم ، و نقص في الأوزان النسبية للخصية و البربخ. بينما سجلت زيادة معنوية في الأوزان النسبية للكبد ، القلب و الطحال خصوصا في المجموعة المعاملة بواسطة أعلى جرعة من البروديفاكوم مقارنة مع المجموعة الشاهدة. دراسة تأثير المبيد على خلايا الدم كشفت عن تغيرات كبيرة عند الأرانب المعاملة مقارنة بالأرانب الشاهدة، كما أن المعالجة بهذه المادة يمكن أنها تسببت أيضا في اضطرابات في بعض المؤشرات البيوكيميائية المدروسة. وبالمثل، لوحظ وجود انخفاض كبير في مؤشرات سرعة و حركة حيوية و كثافة الحيوانات المنوية عند الأرانب المعاملة مقارنة بالشاهد. كما أوضحت الدراسة التشريحية لبعض الأعضاء عن تأثير المبيد على المستوى النسيجي للكبد و الخصيتين.

نتائجنا تقترح ان معاملة ذكور الأرانب بواسطة البروديفاكوم قد أثر في المؤشرات الدموية، البيوكيميائية و كذلك النسيجية وبالتالي ممكن أنه قد أثر على وظيفة التكاثر.

الكلمات المفتاحية: مبيدات القوارض المضادة للتخلر، البروديفاكوم، الدم، التكاثر، الأرنب.

Table des matières

Introduction	1
Partie I : Etude bibliographque	
I.1. Importance de la lutte contre les rongeurs	6
I.1.1. Risque écologique	6
I.1.2. Dégâts économiques	6
I.1.3. Risque sanitaire	7
I.2. Historique.....	9
I.3. Classification des raticides anticoagulants.....	10
I.3.1. Classification chimique.....	10
a. Dérivés de l'hydroxy-4-coumarine	10
b. Dérivés de l'indane-1,3-dione.....	12
c. Dérivés de l'hydroxy-4-benzothiopyranone	13
I.3.2. Classification toxicologique.....	14
I.4. Propriétés physico-chimiques des raticides anticoagulants	18
I.5. Pharmacocinétique des raticides anticoagulants	20
I.5.1. Absorption et distribution.....	20
I.5.2. Biotransformations.....	22
I.5.3. Elimination.....	23
I.5.4. Persistance.....	25
I.6. Mécanisme d'action des raticides anticoagulants	26
I.6.1. Coagulation plasmatique	27
a. L'hémostase primaire	28
b. L'hémostase secondaire	28
c. La fibrinolyse	30
I.6.2. Vitamine K.....	32
a. La famille des vitamines K.....	32
b. Caractéristiques physico-chimiques de la vitamine K1	33
c. Pharmacocinétique.....	34
d. Cycle de la vitamine K ₁	35

I.6.3. Action toxique des anticoagulants.....	37
I.7. Produit utilisé.....	40
I.7.1. Propriétés physico-chimiques	41
I.7.2. Historique et utilisation	41
I.7.3. Devenir dans l'environnement	42
I.7.4. Toxicologie et pathologie	43
I.7.5. Diagnostic et traitement de l'empoisonnement par un anticoagulant.....	53
I.7.6. Les effets sur les animaux non-cibles.....	57

Partie I : Etude expérimentale

II.1. Matériel et méthodes	61
II.1.1. Matériel.....	61
a. Matériel biologique et entretien.....	61
b. Traitement des lapins	62
c. Sacrifice et prélèvements des échantillons.....	62
II.1.2. Méthodes de dosage.....	65
II.1.2.1. Dosage des paramètres hématologiques	65
II.1.2.2. Dosage des paramètres biochimiques	67
II.1.2.2.1. Dosage du glucose.....	67
II.1.2.2.2. Dosage de l'urée	68
II.1.2.2.3. Dosage de la créatinine	70
II.1.2.2.4. Dosage de l'acide urique	72
II.1.2.2.5. Dosage du cholestérol	73
II.1.2.2.6. Dosage des triglycérides	75
II.1.2.2.7. Dosage du calcium.....	77
II.1.2.2.8. Dosage du phosphore.....	79
II.1.2.3. Etude de la biologie des spermatozoïdes	80
II.1.2.3.1. La vitesse des spermatozoïdes.....	80
II.1.2.3.2. Concentration des spermatozoïdes.....	81
II.1.2.3.3. La mobilité des spermatozoïdes.....	82
II.1.2.3.4. La vitalité des spermatozoïdes	82
II.1.2.4. Etude histologique	84

a. Fixation des échantillons	84
b. Déshydratation des échantillons	84
c. Inclusion des échantillons.....	85
d. Confection des coupes histologiques.....	85
e. Coloration	85
II.1.2.5. Analyse statistique des résultats.....	86
II.2. Résultats	87
II.2.1. Influence du traitement sur le poids corporel.....	87
II.2.2. Influence du traitement sur le rapport organo-corporel	87
II.2.3. Influences du traitement sur les paramètres hématologiques	95
II.2.4. Influences du traitement sur les paramètres biochimiques.....	104
II.2.5. Influences du traitement sur la biologie des spermatozoïdes	110
II.2.5.1. Influences du traitement sur la vitesse des spermatozoïdes.....	110
II.2.5.2. Influences du traitement sur la mobilité des spermatozoïdes.....	112
II.2.5.3. Influences du traitement sur la concentration des spermatozoïdes	113
II.2.5.4. Influences du traitement sur la vitalité des spermatozoïdes.....	115
II.2.5.5. Influences du traitement sur l'histologie.....	118
II.3. Discussion	123
Conclusion	136
Perspectives	137
Références bibliographiques.....	138

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

INTRODUCTION

Introduction

Les rats sont une nuisance bien connue des villes et des champs. Ils représentent un grave problème d'hygiène car, ils détruisent les cultures et consomment et abiment les denrées stockées. En effet, ils sont responsables d'importantes pertes économiques liées à la destruction d'environ 20 % des récoltes céréalier mondiale (Riba et Silvy, 1989 ; EPPO, 1995). En 2007, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) rapporte qu'ils sont responsables de la destruction de près de 20 millions de tonnes de denrées alimentaires, perte économique considérable aux répercussions sanitaires non négligeables. Ils peuvent constituer des réservoirs pour différentes maladies transmissibles à l'homme (maladies à transmission vectorielle telles que la leptospirose, la peste, le virus des fièvres hémorragiques à syndromes rénal, l'échinococcose alvéolaire, ... etc) (Trembl *et al.*, 2002 ; Le louarn et Quéré, 2003 ; Pejcoch et Kriz, 2006). Concernant le siècle précédent, l'exemple de l'épidémie de la peste noire qui toucha l'Europe au XIV^{ème} siècle nous rappelle que les rongeurs sont des sources de graves zoonoses, la peste ayant décimé le quart de la population humaine occidentale à cette époque.

Dans ce contexte, l'importance du contrôle des populations de rongeur va être soulignée par les nuisances qu'ils entraînent, et la lutte contre les rongeurs apparaît de ce fait indispensable et fait intervenir plusieurs méthodes biologiques (en favorisant les prédateurs) ou physique (piégeage). Cependant, la lutte chimique à l'aide des raticides anticoagulants qui sont des pesticides très largement employés depuis plus de cinquante ans reste principale (DuVall *et al.*, 1989 ; Bajomi et Kis-Varga, 1990 ; Murphy, 2002). Ils sont très efficaces dans la protection des exploitations agricoles et des habitations (Morrissey *et al.*, 1995 ; Litovitz *et al.*, 1997 ; Maroni *et al.*, 2000 ; Murphy, 2002). Pour le même but, des dérivés de la Brométhaline, le Cholécalciférol et le Fluoroacétate de sodium sont

également utilisés (Dorman *et al.*, 1990 ; Dorman *et al.*, 1992 ; Sherley, 2004). Dans les années 70, de nouvelles molécules plus toxiques, ayant un mode d'action semblable, ont été développées pour résoudre les problèmes de résistance aux anticoagulants de la première génération et améliorer la lutte contre les espèces non résistantes (Boyle, 1960 ; Boschetti *et al.*, 1972 ; Marsh, 1977).

Cette utilisation courante induit la facilité de l'exposition des animaux domestiques et sauvages, et il en résulte de nombreux accidents toxiques sur ces espèces non cibles (Berny *et al.*, 1997 ; Endepols *et al.*, 2003 ; Kohn *et al.*, 2003 ; Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004 ; Binev *et al.*, 2005). Ces intoxications ont bien été étudiées chez les carnivores domestiques (Haug *et al.*, 1992 ; Lewis *et al.*, 1997 ; Blocker et Roberts, 1999 ; Hansen et Beck, 2003 ; Lutze *et al.*, 2003). Les données concernant les ruminants sont beaucoup plus disparates dans la littérature : ils semblent beaucoup moins sensibles que les carnivores domestiques ou sauvages. Une première hypothèse se base sur une possible dégradation par les micro-organismes du rumen. Or, des travaux expérimentaux (Simon, 2000) n'ont pas permis de mettre en évidence ce phénomène. De ce fait, les anticoagulants restent présents et disponibles éventuellement dans le contenu digestif. Si les produits ne sont pas dégradés, nous allons donc explorer l'hypothèse d'une absorption dans la circulation sanguine et des effets éventuels sur les animaux exposés.

Il existe une dizaine de principes actifs des raticides anticoagulants dont le mécanisme d'action est semblable. La classification anglo-saxonne les divise en dérivés de première et de seconde génération. Les produits de la première génération sont toxiques par ingestion répétée, ils comprennent le Dicoumarol, le Coumafène, le Coumatétralyl et la Chlorophacinone. Alors que les raticides de la deuxième génération sont toxiques par

ingestion unique : comme le Brodifacoum, la Bromadiolone, le Difénacoum, la Diféthialone et le Flocoumafène (Petterino et Biancardi, 2001).

La classification française se base sur la durée de persistance dans l'organisme. La première génération (Coumafène, Coumatétralyl et Chlorophacinone) persiste de 7 à 15 jours ; la seconde (Bromadiolone, Difénacoum) de 15 à 21 jours et enfin la troisième (Brodifacoum, Diféthialone) plus de 3 semaines (Buronfosse, 1995).

Le Brodifacoum est un raticide anticoagulant appartenant à la famille des 4-hydroxycoumarine, fortement mortel. Ces dernières années, il est devenu l'un des raticides les plus largement utilisés dans monde. Il est typiquement employé comme raticide antiparasites des mammifères (Eason *et al.*, 2002). Le Brodifacoum, comme la plupart des poisons anticoagulants, a l'avantage qu'un de ses premiers effets est la déshydratation, forçant le rongeur à s'éloigner de l'habitation humaine à la recherche de l'eau. En conséquence, il y a moins de chance que les propriétaires d'une maison rencontreront un rat mort à l'intérieur de leur propriété. De toute façon, les corps déshydratés se dessèchent également plus aisément, probablement laissant une carcasse inodore.

Le Brodifacoum inhibe l'enzyme de la "vitamine K époxyde réductase". Cette enzyme est nécessaire pour la reconstitution de la vitamine K dans son cycle de la vitamine K-époxyde, et ainsi le Brodifacoum diminue solidement le niveau de la vitamine K activé dans le sang. La vitamine K est importante pour la synthèse des substances importantes comprenant la prothrombine, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Cette rupture devient de plus en plus grave jusqu'à ce que le sang perde efficacement n'importe quelle capacité de coaguler.

En outre, le Brodifacoum, ainsi que d'autres doses toxiques des anticoagulants utilisés, augmente la perméabilité des parois des capillaires sanguins, ainsi le plasma sanguin, et le sang lui-même commence à fuir des plus petits vaisseaux sanguins. Un animal empoisonné souffrira progressivement causant une hémorragie interne causant l'état de choc suivi par la perte de conscience et enfin la mort.

Il est indiqué dans la bibliographie que le Brodifacoum est fortement mortel aux mammifères et oiseaux, surtout aux poissons (Peterson et Streeter, 1996 ; McConnico *et al.*, 1997 ; Munday et Thompson, 2003 ; Shore *et al.*, 2003 ; Pachtinger *et al.*, 2008 ; Beal *et al.*, 2008 ; Waddell *et al.*, 2013). C'est un poison fortement cumulatif, dû à son haut lipophile et son élimination extrêmement lente, ce qui l'a classé comme étant un produit extrêmement毒ique.

Il nous a donc semblé intéressant de présenter une vue aussi complète que possible sur les raticides anticoagulants et leurs effets toxiques. Une attention spéciale a été accordée au raticide anticoagulant très utilisé « le Brodifacoum », notamment sur la reproduction chez la population d'une espèce non cible (Petrus et Henik, 1999). Il a également fait l'objet d'une recherche attentive.

Donc, nous nous sommes posés la question sur l'éventuelle toxicité des raticides anticoagulants très utilisés depuis longtemps sur la santé des populations non cibles comme le lapin. La description effectuée dans ce travail permettra de compléter les études précédentes sur les effets toxiques des raticides anticoagulants sur quelques paramètres physiologiques chez le lapin.

Dans une première section, après avoir présenté les objectifs de ce projet, notre travail élucidera tout d'abord la conception des raticides anticoagulants, qui sera bien détaillée en décrivant l'évolution de ces derniers depuis la tombée accidentel sur la moise jusqu'à la

création de la 3^{ème} génération dans une étude bibliographique générale des raticides anticoagulants utilisés dans le monde et spécialement en Algérie, avec une description détaillée des caractéristiques physico-chimiques de ces composés, leur importance, leur mode d'utilisation et leur devenir. Nous citerons aussi la toxicité de ces raticides en insistant sur les risques qu'ils peuvent présenter pour les animaux non cibles, pour l'environnement et notamment pour l'homme.

Une deuxième section expérimentale, elle comporte trois parties. Dans la première (matériel et méthodes) nous décrirons les méthodes utilisées dans ce travail et la préparation des échantillons. Dans la deuxième partie nous statuerons sur les résultats obtenus à travers le dosage des paramètres biochimiques, hématologiques, histologiques et les paramètres de la reproduction et nous discuterons ces derniers dans une troisième partie (la discussion).

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

ÉTUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Etude bibliographique

Pour débuter cette partie, l'importance du contrôle des populations de rongeurs va être soulignée par les nuisances qu'ils entraînent. Les rongeurs provoquent des dégâts multiples du fait de leur commensalisme.

I.1. Importance de la lutte contre les rongeurs

I.1.1. Risque écologique

Le risque écologique est surtout présent dans les territoires vierges, où les rongeurs ont été introduits via les activités humaines (transports maritimes essentiellement). Ils bousculent les niches écologiques, entrant en compétition alimentaire avec la faune indigène ou la mettant en péril par un comportement prédateur. Les rats sont une menace pour les espèces endémiques protégées. Les rongeurs ont été identifiés comme la première cause de mise en danger de ces espèces par consommation des œufs et des jeunes poussins en période de nidification durant l'été austral (Bridier *et al.*, 2006).

I.1.2. Dégâts économiques

Les dégâts les plus importants sont causés sur les cultures et les stocks céréaliers. On estime qu'un cinquième à un tiers des cultures mondiales est consommé ou contaminé par les rats chaque année, d'où des répercussions économiques et sanitaires considérables pour la population humaine. Les dégâts sont majeurs en ce qui concerne les plantes à graines (maïs) et tubercules (patates douces), ainsi que les cultures fruitières (ananas) et les champs de canne à sucre. Le pillage par les rats des réserves céréaliers au sein des élevages est également endémique (Bridier *et al.*, 2006).

Outre la consommation des denrées alimentaires, les rats sont également responsables de dégâts matériaux dans les usines ou les maisons. Des incendies peuvent même être provoqués par dégradation des conduites de gaz ou encore des gaines d'isolation des fils électriques (Leman, 1983).

I.1.3. Risque sanitaire

Le risque majeur entraîné par la pullulation des rats à proximité des activités humaines est un risque sanitaire pour la santé publique (Maros, 2000). En effet, ces mammifères sont potentiellement vecteurs de nombreuses maladies transmissibles à l'homme, mais également aux animaux domestiques (Goncalves Da Cruz, 2007). La présence des animaux dans nos maisons implique un programme de lutte sérieux contre les rongeurs vivants afin de protéger les animaux familiers et par là, leurs propriétaires avec qui ils ont souvent de nombreux rapports affectifs (Gallen, 2000 ; Boussarie, 2005).

Les sources d'infection ou d'infestation sont soit les rongeurs eux-mêmes, malades ou porteurs sains, soit le milieu extérieur. Ce dernier constitue la principale source de maladies dans le cas des rongeurs sauvages. Tout l'environnement des animaux peut être contaminé : le sol, l'air, l'eau ou les objets faisant partie de leur habitat. En matière de réceptivité, le risque est plus important chez les enfants et les personnes âgées car leur système immunitaire est moins compétent (Dagnac, 2004). Les enfants sont également plus sujets à contracter une zoonose par leur manque d'hygiène. Ils touchent les animaux ou la terre, puis ont tendance à porter leurs doigts à la bouche sans se laver les mains. Le tableau 1 cite les principales zoonoses (Leman, 1983). La pullulation des rongeurs est responsable d'une cinquantaine d'hospitalisations et de 5 à 10 décès par an en moyenne (Bridier *et al.*, 2006).

Tableau 1 : Principales zoonoses transmises par les rongeurs (Leman, 1983).

Types de zoonose	Exemples
Zoonoses bactériennes	<ul style="list-style-type: none"> - leptospirose - peste - campylobactériose - listériose - pasteurellose - yersiniose - salmonellose - sodoku (<i>Spirillum morsus muris</i>) - septicémie à <i>Streptobacillus moniliformis</i> - tularémie - bordetellose
Zoonoses virales	<ul style="list-style-type: none"> - rage - chorioméningite lymphocytaire - fièvre hémorragique avec syndrome rénal - encéphalite d'Europe centrale
Zoonoses parasitaires	<ul style="list-style-type: none"> - gale (<i>Sarcoptoïdea</i>) - hyménolépidoses - cryptosporidiose - pneumocytose - giardiose - strongyoïdose - échinococcose
Rickettsioses	<ul style="list-style-type: none"> - typhus murin - fièvre boutonneuse - fièvre Q - fièvre varicelliforme
Protozoonoses	<ul style="list-style-type: none"> - leishmaniose - toxoplasmose - babésioses
Zoonoses mycosiques	<ul style="list-style-type: none"> - teigne - cryptococcose - candidose

I.2. Historique

C'est en 1921 qu'un canadien Schofield décrivit sous le nom de « sweet clover disease» une maladie hémorragique du bétail consécutive à l'ingestion de mélilot moisi. Il ouvrait ainsi la porte à des travaux qui menèrent, en 1941 à l'isolement de la substance responsable de ces accidents, une molécule naturelle 3,3'-methylene-bis (4-hydroxycoumarin), appelée par la suite Dicoumarol (Moreau *et al.*, 2012). L'intérêt pratique de cette découverte fut mis en évidence en 1948 par O'Connor (1948) qui proposa l'utilisation du Dicoumarol comme raticide. Plusieurs travaux ont étudié de nombreuses molécules analogues et notamment la Warfarine (ou Coumafène) dans la même année (Pelfrene, 1991), introduite à la fois comme antithrombotique et à l'origine d'un médicament efficace pour le traitement des thromboembolies chez l'homme, mais aussi en tant que raticide (Berry *et al.*, 2000 ; Crowther *et al.*, 2000 ; Price *et al.*, 2000). Depuis cette époque les raticides anticoagulants (antivitamine K) sont très largement utilisés dans le monde pour contrôler les populations de petits mammifères et occupent la première place dans la lutte contre différents rongeurs anthropophiles commensaux (rat noirs, surmulot, souris) ou ravageurs des cultures (mulots, campagnols, ragondins) (Erickson et Urban, 2002).

En fonction de la substance active, ils peuvent être ainsi utilisés soit dans ou autour des bâtiments ou alors en nature pour contrôler les rongeurs champêtres et certains autres mammifères « nuisibles ». Les anticoagulants présentent de nombreux avantages, notamment celui d'avoir une action différée par rapport à l'ingestion de l'appât permettant ainsi d'éviter leur refus observé avec des toxiques plus foudroyants mais aussi celui de posséder un antidote (la vitamine K₁) qui permet de réduire considérablement les accidents chez l'homme et les animaux domestiques (Kolf-Clauw *et al.*, 1995). Ces caractéristiques

sont expliquées par le mécanisme d'action de ces substances qui interviennent en bloquant le cycle de la vitamine K (Le Bonniec, 2004).

I.3. Classification des raticides anticoagulants

Il existe une dizaine de principes actifs dont le mécanisme d'action est semblable. Les raticides anticoagulants peuvent être classés sur des critères chimiques ou toxicologiques.

I.3.1. Classification chimique

Les raticides anticoagulants dérivent de trois grandes familles chimiques :

- ❖ les dérivés de l'hydroxy-4-coumarine,
- ❖ ceux de l'indane-1,3-dione,
- ❖ et ceux de l'hydroxy-4-benzothiopyranone.

Toutes les molécules présentent une analogie structurale avec les vitamines K, surtout la vitamine K₁ naturelle ou Phytoménadione, et la vitamine K₃ synthétique ou Ménadione (Rochette, 1985 ; Kolf-Clauw *et al.*, 1995 ; Huguet, 1998 ; Petterino et Biancardi, 2001).

a. Dérivés de l'hydroxy-4-coumarine

■ Structure

La figure 1 représente la structure chimique de l'hydroxy-4-coumarine :

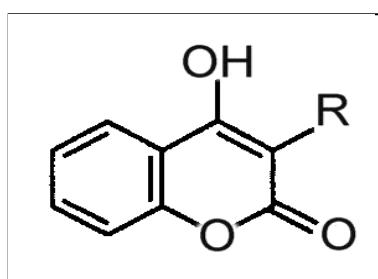


Figure 1 : Présentation de la structure chimique de l'hydroxy-4-coumarine (O'Neil, 2001)

Ces dérivés comprennent un noyau de base composé d'un cycle coumarine hydroxylé en position -4. A partir de cette structure, toute une série de molécules a été développée par ajout de groupements en position -3 sur le cycle. Le coumafène, chef de file de cette famille est représenté dans la figure ci-dessous (figure 2).

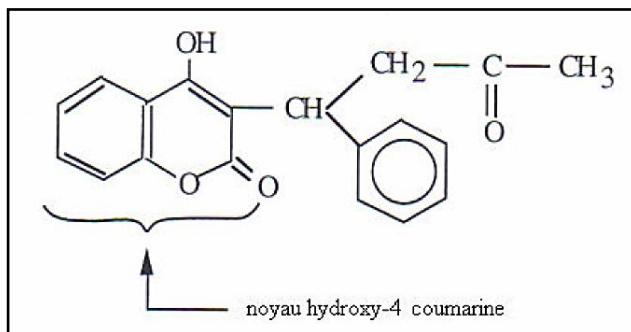


Figure 2 : Formule développée du Coumafène (Mathet, 1996 ; O’Neil, 2001)

Cette famille comprend le Brodifacoum, la Bromadiolone, le Coumachlore, le Coumafène, le Coumatétralyl, le Difénacoum et le Flocoumafène. La structure du Coumafène et de la Bromadiolone est représentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Structures du coumafène et de la Bromadiolone (O’Neil, 2001).

Coumafène	Bromadiolone
3-(alpha-acétonylbenzyl)-4-hydroxycoumafène	3-[3-(4'bromobiphényl-4-yl)-3-hydroxy-1-phénylpropyl]-4-hydroxycoumarine

■ Caractéristiques

Le tableau 3 illustre les principales caractéristiques du Coumafène et de la Bromadiolone.

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

Tableau 3 : Principales caractéristiques du Coumafène et de la Bromadiolone (Gaillard, 1996 ; Rodrigues, 2006).

Molécule	Formule brute	Poids moléculaire	Propriétés physico-chimiques	Température de fusion
Coumafène	$C_{19}H_{16}O_4$	308,4	Poudre cristalline blanche, insoluble dans l'eau, soluble dans de nombreux solvants organiques	161-162°C
Bromadiolone	$C_{30}H_{23}BrO_4$	527,4	Poudre blanche, insoluble dans l'eau, l'hexane et éther. Soluble dans l'acétone et l'éthanol	228-232°C

b. Dérivés de l'indane-1,3-dione

Les dérivés de synthèse sont obtenus par la substitution en position -2 du noyau de base, qui est un cycle indane-1,3-dione. On peut citer la Chlorophacinone, la Pindone et la Diphacinone (figure 3) (figure 4) (O'Neil, 2001).

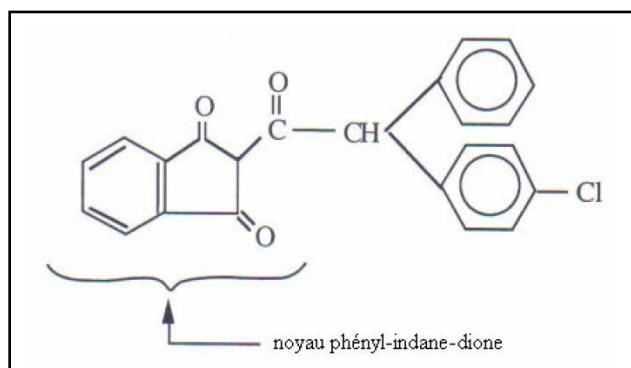


Figure 3 : Formule développée de la Chlorophacinone (O'Neil, 2001).

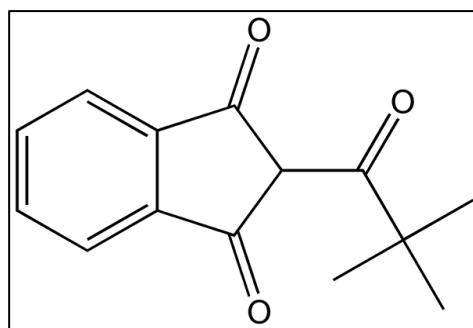


Figure 4 : Structure chimique du Pindone (O’Neil, 2001).

▪ Caractéristiques

Les caractéristiques physico-chimiques de la Chlorophacinone sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Principales caractéristiques physico-chimiques de la Chlorophacinone (Gaillard, 1996 ; Viallet, 1998).

Formule brute	Poids moléculaire	Propriétés physico-chimiques	Température de fusion
$C_{23}H_{15}O_3Cl$	374,82	Poudre cristalline jaunâtre, insoluble dans l'eau, soluble dans de nombreux solvants organiques dont l'acétone et l'éthanol	141-145 °C

c. Dérivés de l'hydroxy-4-benzothiopyranone

Il existe un seul dérivé actuellement commercialisé : la Diféthialone. Cette molécule comprend comme noyau de base un noyau coumarine dans lequel l'atome d'oxygène

du cycle est remplacé par un atome de soufre (figure 5). Par abus de langage, il est apparenté aux dérivés coumariniques.

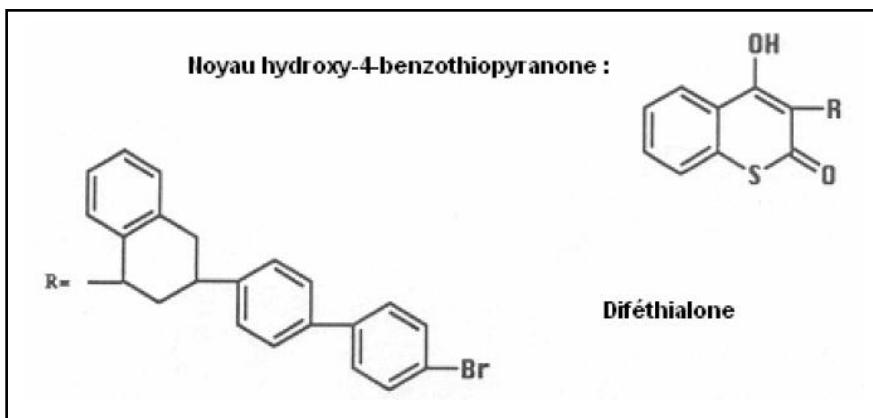


Figure 5 : Dérivés de l'hydroxy-4-benzothiopyranone (O'Neil, 2001).

I.3.2. Classification toxicologique

En fonction de leur toxicité, on décrit habituellement plusieurs générations d'anticoagulants (tableau 5). La classification en générations tient compte de deux critères :

- La classification anglo-saxonne les divise en dérivés de première et de seconde génération (importance de la toxicité). Les premiers sont toxiques par ingestion répétée (accumulation), ils comprennent le Dicoumarol, le Coumafène, le Coumatétralyl et la Chlorophacinone. Les seconds le sont par ingestion unique : ce sont le Brodifacoum, la Bromadiolone, le Difénacoum, la Diféthialone et le Flocoumafène (Petterino et Biancardi, 2001).
- La classification française se base sur la durée de persistance dans l'organisme. La première génération (Coumafène, Coumatétralyl et Chlorophacinone) persiste de 7 à 15 jours ; la seconde (Bromadiolone, Difénacoum) de 15 à 21 jours et enfin la troisième (Brodifacoum, Diféthialone) plus de 3 semaines (Buronfosse, 1995).

Tableau 5 : Familles et générations de raticides anticoagulants (Buronfosse, 1995 ; Kolf-Clauw, 1995 ; Rodrigues, 2006 ; ACTA, 2007)

	Première génération	Deuxième génération	Troisième génération
Persistante hépatique			
Famille d'anticoagulants	7 à 15 jours	15 à 21 jours	Plus de 3 semaines
Hydroxy-4-coumarine	Coumafène Coumachlore Coumatétralyl	Difénacoum Bromadiolone	Brodifacoum Flocoumafène
Indane-1,3-dione	Diphacinone Chlorophacinone		
Hydroxy-4-benzothiopyranone			Diféthialone

NB : la persistance hépatique correspond à celle prise en compte pour le traitement.

La persistance totale est plus longue.

Les composés dits de première génération sont les moins toxiques et nécessitent le plus souvent des ingestions répétées ou de très fortes doses pour intoxiquer les rongeurs. Les dérivés coumariniques (ceux de l'hydroxy-4-coumarine) en font partiellement partie. Il s'agit des composés les plus anciens. Leur chef de file est le Coumafène (ou Warfarine), dont les applications raticides sont apparues dans les années 1950 (Berny, 2006).

En réponse au développement de souches de rat résistantes aux composés de la première génération, des dérivés plus récents et plus efficaces sont apparus sur le marché. Les deuxième et troisième générations comportent des molécules beaucoup plus toxiques,

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

mortelles dès la première ingestion chez le rat pour les dérivés de troisième génération, elles présentent une DL_{50} jusqu'à 50 fois plus faible que celle du Coumafène (Petterino et Biancardi, 2001).

La DL_{50} correspond à la dose ingérée de toxique qui provoque la mort de 50 % des animaux dans un lot expérimental. Cette valeur apporte des renseignements importants sur la toxicité aiguë d'une molécule. Pour les PCO (Pest Control Operators ou entreprise de destruction des nuisibles) (Buronfosse, 1995), la DL_{50} des raticides anticoagulants apparaît souvent comme un critère de choix des matières actives contenues dans les appâts car cette valeur permet de comparer plusieurs molécules sur leur efficacité potentielle. Cependant, l'efficacité des anticoagulants dépend également d'autres facteurs : d'une part du temps de stockage de ces molécules dans le foie des rongeurs, et d'autre part de la quantité libre et active d'anticoagulants, c'est-à-dire non fixée aux protéines du sang (Berny et Lasseur, 2006). D'une manière générale, les PCO privilégient de plus en plus les composés de la dernière génération, les plus puissants et les plus efficaces.

La classification toxicologique des anticoagulants donne de précieux renseignements sur l'efficacité du produit dans la lutte contre les rongeurs, mais également sur sa toxicité lors d'ingestion accidentelle. En pratique, cette classification est la plus utilisée par les PCO et les vétérinaires (Viallet, 1998).

La dose toxique d'un raticide anticoagulant varie en fonction de sa génération et de type de consommation, unique ou répétée. Le tableau 6 récapitule les doses toxiques pour différents anticoagulants, classés selon leur génération.

Tableau 6 : Toxicité des principaux anticoagulants pour différentes espèces (DL₅₀ en mg/kg) (Huguet, 1998).

	Rat	Souris	Lapin	Chien	Chat	Porc	Poulet
Chlorophacinone	2,1-3,5	1,16	50	50-100 0,005 /j x 10j	50-100	25	Canard : 100
Coumafène	3-186 1 /j x 5j	331-374	800	20-200 2,3-5 /j x 5j	6-50 1-3 /j x 5j	1-50 3 /j x 5j 0,05-0,4 /j x 7j	1000 10 /j x 5j
Coumatétrayl	5-25 0,3 /j x 5j		10	35	50		>3000 50 /j x 8j 10 /j x 12j
Bromadiolone	0,5-1,125 0,06-0,14 /j x 5j	0,99-1,75	1	10-25	25	1 /j x 5j	1,4 /j x 12j
Diphacinone	1,5-3	140-340	35	3-7,5 0,08-2 /j x 3j	14,7	125-150	
Difénacoum	1,8-7 0,16-0,18 /j x 5j	0,8	2	25-50	100	80-100	50-100 1,6 /j x 12j
Brodifacoum	0,26 0,05-0,08 /j x 5j	0,4	0,2-0,3	0,25-4	25	0,25-2	2-20 1,5 /j x 6j
Difféthialone	0,56		1,29		4	16	2
Flocoumafène							

I.4. Propriétés physico-chimiques des raticides anticoagulants

Les propriétés physico-chimiques des raticides anticoagulants conditionnent leur conservation et leur utilisation dans les appâts. Tous ces dérivés sont des composés de synthèse. Caractères importants pour leur utilisation lors des campagnes de dératisation, ils sont pour la plupart :

- ✓ Stables aux agressions extérieures : lumière, humidité (sauf la Bromadiolone), variation de température.
- ✓ Inodores et insipides.

Les propriétés physico-chimiques diffèrent légèrement d'un composé à l'autre et sont utilisées pour leur identification en toxicologie analytique, rendant possible leur dosage dans les produits biologiques. Ces propriétés sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques des principaux raticides anticoagulants (Gaillard, 1996 ; Loyau, 1996).

	Aspect physique	couleur	Pm	point de fusion (°C)	solubilité
Brodifacoum <chem>C31H23O3</chem>	Poudre	Blanc jaunâtre	523,4	228-232	(-) eau, benzène (+) acétone, chloroforme
Bromadiolone <chem>C30H23BrO4</chem>	Poudre non cristalline	Blanc jaunâtre	527,4	200-210	(-) eau, hexane, éther (+) acétone, éthanol, diméthylformamide
Chlorophacinone <chem>C23H15O3Cl</chem>	Poudre cristallisée	Jaune pâle	374,8	141-145	(-) eau, éther, hexane (+) acétone, alcool, chloroforme, acétate d'éthyl, acide acétique, benzène

Coumafène $C_{19}H_{16}O_4$	Cristaux	Blanc	308,4	161-162	(-) eau, benzène, éther, cyclohexane, alcool (+) acétone, dioxane, solutions alcalines
Coumatétralyl $C_{19}H_{16}O_3$	Cristaux	Jaunâtre	292,6	166-172	(+) eau, alcool, acétone
Difénacoum $C_{31}H_{24}O_3$	Poudre cristalline	Incolore à blanc passé	444,5	215-217	(-) eau, alcool, benzène (+) acétone, Chloroforme
Diféthialone $C_{31}H_{23}BrO_2S$	Poudre	Blanc à légèrement jaunâtre	539,5	233-236	(-) eau, hexane, alcool, acétone, chloroforme, (+) diméthylformamide
Flocoumafène $C_{33}H_{25}F_3O_4$	Solide	Blanchâtre	542,6	Isomère cis : 191-181 Isomère trans : 163-166	(-) eau (+) acétone, alcool, chloroforme, dichlorométhane

PM : Poids Moléculaire

(-) : insoluble ou moyennement soluble

(+) : soluble

Dans leur globalité, les raticides anticoagulants sont très peu solubles dans l'eau. Leur solubilité dans les différents solvants organiques employés au laboratoire est assez variable, ce qui rend particulièrement difficile la mise au point d'une méthode polyvalente permettant l'extraction concomitante de tous les anticoagulants (Rodrigues, 2006).

Les raticides anticoagulants sont des composés relativement stables et inodores, ce qui facilite leur utilisation lors des préparations d'appâts. Pour les analyses toxicologiques, les

propriétés spectroscopiques et fluorimétriques sont actuellement les plus utilisées. Enfin, les propriétés physico-chimiques conditionnent la pharmacocinétique des anticoagulants dans les organismes vivants (Simon, 2000).

I.5. Pharmacocinétique des raticides anticoagulants

L'étude toxicocinétique des anticoagulants est fondamentale pour comprendre la symptomatologie des intoxications aux antivitamines K et les enjeux de la thérapie à mettre en œuvre.

I.5.1. Absorption et distribution

L'absorption des anticoagulants est conditionnée par leurs caractéristiques de solubilité : ce sont des composés polycycliques présentant un caractère hydrophobe et acide faible. Elle se fait principalement après ingestion mais aussi par résorption à travers la peau et le système respiratoire. Ces deux derniers modes d'absorption étant peu impliqués dans le transfert de la molécule à travers les niveaux trophiques, nous centrerons notre intérêt sur son absorption et sa distribution après ingestion. Après ingestion, l'absorption se fait principalement par diffusion passive au niveau des segments proximaux du tractus digestif, en particulier dans le duodénum (Goodman et Gilman, 1975). Elle est rapide avec un maximum d'absorption atteint en deux à six heures, la totalité étant absorbée en 24 heures (Vandenbroucke *et al.*, 2008). Des études sur des rats avec des molécules marquées administrées par gavage ont montré que la Bromadiolone était rapidement absorbée et détectable dans le plasma une heure après l'ingestion pour être maximale entre trois et six heures, et totale en 24 heures (Lipha, 1987).

Les anticoagulants quittent le foie par la veine hépatique et le transport sanguin se fait, en partie, sous forme libre dans le plasma, mais surtout sous forme liée aux albumines plasmatiques avec un taux de fixation de 70 % à 99 % selon le produit considéré (> 98,8 % pour la Bromadiolone) (Lipha, 1982, Nahas, 1984). Le Coumafène par exemple est présent dans le plasma sous forme liée au site I de l'albumine à raison de 98 à 99,5 %. Seule la fraction libre est active, ce qui implique que les anticoagulants sont globalement très peu disponibles. La fixation aux albumines va permettre une libération progressive, d'où une action prolongée. Du fait de cette forte fixation aux protéines plasmatiques, des interactions médicamenteuses sont décrites (avec le paracétamol notamment). Certains ligands déplacent le Coumafène de l'albumine, provoquant une augmentation de la forme libre, et donc une activité toxique accrue. Cependant, les interactions entre les formes libres et liées sont encore mal connues (Deepa et Mishra, 2005). Le foie est le principal organe d'accumulation des anticoagulants avec une concentration maximale observée dans les 9 heures qui suivent l'ingestion (Kemikalieinspektionen, 2006). Cette fixation hépatique est la caractéristique essentielle de leur distribution et le site récepteur hépatique commun aux coumariniques semble être similaire pour les Indanediones (Kolf-Clauw *et al.*, 1995) (figure 6). L'élimination des anticoagulants dans le plasma est biphasique avec une première diminution très rapide des concentrations suivie d'une phase plus lente. Par exemple, la demi-vie de la Bromadiolone dans le plasma de rats durant cette 1^{ère} phase est de 9,5 heures puis de 5 jours en moyenne pour cette seconde phase (Kemikalieinspektionen, 2006). La demi-vie plasmatique varie selon le composé et l'espèce animale. Par exemple, elle est de 36 heures chez le rat (*Rattus norvegicus*) pour le Coumafène (Rochette, 1985 ; Rodrigues, 2006). L'élimination dans le foie suit le même pattern mais cette fois-ci avec une persistance beaucoup plus longue. Par exemple chez le rat, pendant les 28 premiers jours qui suivent

une administration orale de Bromadiolone, le déclin des concentrations hépatiques est relativement rapide avec une demi-vie de 17 jours. La demi-vie durant la 2^{ème} phase d'élimination est ensuite de 318 jours (Erickson et Urban, 2002). Leur affinité pour les récepteurs hépatiques explique que la durée d'action des anticoagulants dépasse amplement la persistance plasmatique. Cette affinité étant plus marquée pour les composés les plus récents, cela se traduit par une persistance plus importante de ces composés dans l'organisme (Kolf-Clauw *et al.*, 1995) et donc une action anticoagulante plus longue. Enfin, les anticoagulants passent dans le lait et à travers le placenta, ce qui représente une importance thérapeutique majeure.

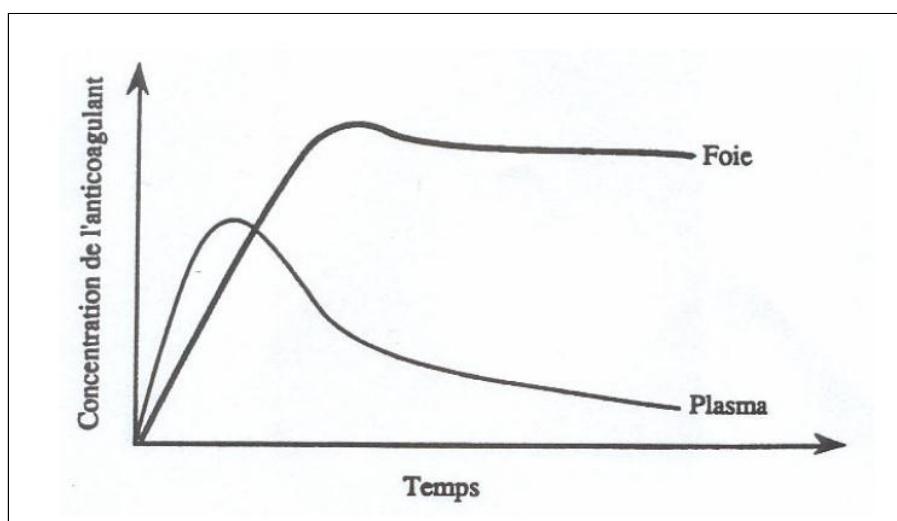


Figure 6 : Représentation théorique des cinétiques plasmatiques et hépatique des raticides anticoagulants chez le rat (Huguet, 1998 ; Mathet, 1996).

I.5.2. Biotransformations

Les biotransformations s'effectuent au niveau du foie. Les réactions de biotransformation sont variables en fonction du composé : il y aura par exemple formation d'un alcool pour le Coumafène et d'une glycurono-conjugaison pour la coumarine (Jeannin, 1983 ;

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

Cloet-Chabre, 1998). Les alcools formés lors de la dégradation ont encore une très légère activité anticoagulante (Loyau, 1996). Pour les composés de la première génération, une faible partie du toxique ne subit aucune modification mais la majorité est métabolisée. La dégradation du Coumafène chez le rat implique une hydroxylation (USEPA, 1998). Le métabolisme est presque exclusivement assuré par la famille d'enzyme des cytochromes P450 et en particulier par le CYP 2C9 pour le Coumafène (Lasseur, 2006). Pour expliquer cette métabolisation, de nombreux travaux ont porté notamment sur l'implication de cette famille enzymatique des cytochromes P-450 et plus particulièrement les CYP 2C9 puisque c'est par ailleurs la famille d'enzymes qui réalise 90 % de la métabolisation des principaux médicaments, et cela au niveau hépatique. Les anticoagulants, notamment le Coumafène, sont très largement prescrits chez l'homme pour la prévention et le traitement des maladies thrombo-emboliques (Linder, 2001). De ce fait, les études *in vitro* du métabolisme des anticoagulants ont été principalement réalisés sur les dérivés coumariniques les plus utilisés en clinique notamment le Coumafène et l'Acénocoumarol (Thijssen et Ritzen, 2003). Peu d'études disponibles semblent concerter la toxicocinétique des anticoagulants spécifiquement utilisés en tant que raticide mais les SGARs tels que la Bromadiolone, semblent quant à eux principalement excrétés inchangés (OMS, 1995).

I.5.3. Elimination

Après la biotransformation, l'élimination des anticoagulants se fait principalement par voie biliaire (70 %), sous forme de glycuronoconjuguée. Les métabolites sont hydrolysés au niveau intestinal et subissent par réabsorption un cycle entéro-hépatique, d'où une prolongation de leur activité toxique (Huguet, 1998), ensuite ils peuvent être réabsorbés dans le sang (OMS, 1995). Une grande proportion des composés ingérés est excrétée

à travers les fèces. Cette élimination terminale est relativement rapide : elle atteint 90 % dans les deux premiers jours pour la Chlorophacinone (Jeannin, 1983). Selon Poché (1986), chez le rat, 53,3 % de la Bromadiolone est excrétée par voie biliaire dans les 2 jours et plus de 89 % dans les quatre jours qui suivent l'ingestion de la molécule. Ceci pourrait ainsi contribuer, en plus de la persistance hépatique, à l'action relativement longue des anticoagulants (Huguet, 1998). Cependant la rémanence hépatique importante ainsi que le cycle entéro-hépatique des anticoagulants rend difficile et longue leur élimination totale. L'élimination est considérée comme suffisante d'un point de vue thérapeutique après 15 jours pour les dérivés coumariniques (Bromadiolone, Coumafène, ...) et après 30 jours pour les dérivés de l'Indanedione (Diphacinone, ...) et pour le Difénacoum (ACTA, 1997). Ces délais imposent la durée du traitement, mais l'élimination totale des anticoagulants est bien plus longue (plus d'une centaine de jour chez la caille) (Loyau, 1996). Les phénomènes de coprophagie peuvent aussi induire une réabsorption des anticoagulants excrétés dans les fèces. Aucune excréption de la Bromadiolone n'a été constatée dans l'air expiré et très peu de Bromadiolone est éliminée dans les urines (0,86 % de la dose ingérée au bout de 48 heures) (Poché, 1986). En précision aux données de l'OMS (1995) citées ci-dessus, chez le rat, l'analyse de molécules marquées dans les fèces et dans des extraits de tube digestif a montré qu'environ 22 % de la radioactivité totale était retrouvée sous forme de Bromadiolone inchangée dans les fèces et 6 % dans le tube digestif alors que 15 % de la dose totale était retrouvée sous forme d'un métabolite dans les fèces et 4 % dans les extraits de tube digestif. Ce métabolite majeur a été identifié comme une forme hydroxylés de la molécule mère (Kemikalieinspektionen, 2006). La figure 7 représente de manière simplifiée le métabolisme des antivitamines K.

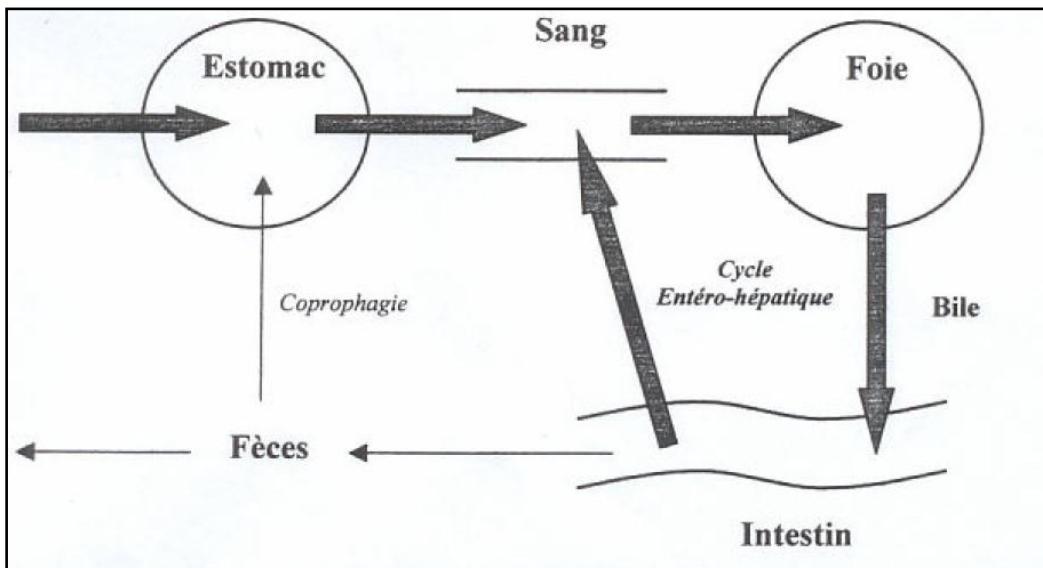


Figure 7 : Représentation schématique du métabolisme des anticoagulants chez les rongeurs (Huguet, 1998)

I.5.4. Persistance

La rémanence hépatique des antivitamines K₁ est la caractéristique essentielle de leur mécanisme d'action. Leur affinité pour les récepteurs hépatique explique que la durée d'action des raticides anticoagulants ne puisse être directement reliée à leur temps de demi-vie plasmatique. Ainsi dans le cas de la Bromadiolone, le temps de demi-vie plasmatique chez le chien est de 6 jours, alors que la persistance toxicologique dans l'organisme est de l'ordre de 2 à 3 semaines (Rodrigues, 2006). Au-delà, des traces d'anticoagulant sont toujours présentes mais en concentration insuffisante pour déclencher des signes cliniques.

Plus le raticide anticoagulant est d'une génération récente, plus son affinité pour les récepteurs hépatiques ainsi que la persistance au niveau des hépatocytes sont élevées. Au cours des dernières années, des anticoagulants de plus en plus puissants et rémanents ont été mis sur le marché pour faire face à des problèmes latents de résistance dans certaines

colonies de rongeurs. Le Brodifacoum et la Diféthialone, les derniers représentants mis sur le marché, présentent ainsi une toxicité et une persistance hépatique bien supérieures aux composés de la première génération. Lors d'intoxication d'espèces non-cibles, il convient de se renseigner autant que possible sur la nature exacte du toxique en cause, afin de connaître sa rémanence hépatique et d'ajuster la durée du traitement. A notre connaissance, seuls Delley et Joseph (1985) et Giraudoux *et al.* (2006) ont étudié les résidus de Bromadiolone dans les tissus de rongeurs en conditions naturelles. Delley et Joseph (1985) ont mesuré les résidus dans des campagnols terrestres exposés à des appâts contenant 140 mg/kg de Bromadiolone pendant trois jours après un traitement. Les concentrations mesurées dans la totalité du corps atteignaient alors 0,91 mg/kg en moyenne. Giraudoux *et al.* (2006) ont montré que les résidus de Bromadiolone dans une population de campagnol terrestre restaient stables pendant 10 jours après le traitement et ont conclu que de tels niveaux de résidus dans les rongeurs pouvaient conduire à des doses journalières ingérées par des prédateurs supérieures à la DL₅₀ pour différentes espèces vertébrées. Cependant, aucune donnée n'est pour l'instant disponible sur des durées plus longues. Pour résumer, le métabolisme des anticoagulants se caractérise par une très bonne absorption orale, une distribution essentiellement hépatique (90 %) et une persistance hépatique variant en fonction de la génération du produit considéré. La rémanence hépatique conditionne la durée d'action de l'anticoagulant et, par conséquent, la durée du traitement à mettre en place lors d'intoxication d'espèces non cibles.

I.6. Mécanisme d'action des raticides anticoagulants

Tous les anticoagulants possèdent un mécanisme d'action semblable qui est basé sur des analogies structurales avec la vitamine K en provoquant son perturbation du métabolisme.

Leur mécanisme d'action aboutit à l'inhibition de l'activation hépatique de quatre facteurs de la coagulation sanguine, dits « vitamine K₁ dépendants », d'où l'apparition de signes cliniques liés à un trouble de l'hémostase (Grand, 1976 ; Pelfrene, 1991 ; Berny et Lasseur, 2006).

Un rappel de la cascade de coagulation sanguine est nécessaire pour comprendre le schéma pathogénique. Ensuite, le cycle de la vitamine K et la cible biochimique des anticoagulants sont décrits.

I.6.1. Coagulation plasmatique

Les raticides anticoagulants entraînent l'inhibition de la synthèse hépatique des facteurs de la coagulation « vitamine K dépendants ». Lorsque l'organisme a épuisé l'ensemble des facteurs PPSB actifs, les mécanismes de l'hémostase secondaire se bloquent et des coagulopathies apparaissent rapidement.

Les facteurs PPSB sont communément appelés pour :

- ✓ Prothrombine (facteur II)
- ✓ Proconvertine (facteur VII)
- ✓ Facteur de Stuart (facteur X)
- ✓ et facteur anti-hémophilique B (facteur IX)

❖ Rappel sur l'hémostase

L'hémostase constitue l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir la circulation du sang dans le système vasculaire assurant la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas de rupture de la continuité de la paroi vasculaire tout en évitant la formation d'obstacle à la circulation. L'hémostase est schématiquement une

succession de trois étapes: l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire et la fibrinolyse (Jain, 1993 ; Lewis, 1996).

a. L'hémostase primaire

L'hémostase primaire correspond à la formation du thrombus plaquettaire ou « thrombus blanc ». Elle se décompose en deux temps :

- un temps vasculaire, qui correspond à une vasoconstriction réflexe et immédiate du vaisseau lésé d'où une réduction de diamètre de sa lumière. Les plaquettes sont également activées par leur mise en contact avec le sous endothélium du vaisseau lésé.
- un temps plaquettaire, qui aboutit à la formation du clou plaquettaire, obturant de manière provisoire la brèche vasculaire. Le clou plaquettaire nécessite l'intervention de facteurs plasmatiques qui font les intermédiaires entre la brèche et les plaquettes. Ces facteurs sont le facteur de Von Willebrand et/ou le facteur VII, qui permettent une adhésion des plaquettes sur la lésion, ainsi que le fibrinogène, qui permet d'accrocher les plaquettes les unes aux autres.

b. L'hémostase secondaire

L'hémostase secondaire correspond à l'étape de coagulation au sens strict. Elle aboutit à la formation d'un caillot sanguin composé de filaments très solides de fibrine, qui emprisonnent les hématies.

La coagulation met en jeu une cascade de réactions enzymatiques. Il existe deux voies d'activation de la coagulation, qui en pratique sont plus ou moins imbriquées. La voie endogène ou intrinsèque ne faisant intervenir que des facteurs plasmatiques, dont le premier est activé au contact du sous endothélium vasculaire, la voie exogène ou

extrinsèque nécessitant le passage dans le sang d'un facteur tissulaire, libéré par la destruction des cellules endothéliales suite à une brèche.

Les deux voies se rejoignent par l'activation d'une protéine commune : le facteur X ou de Stuart. A l'issue de cette voie commune se forme la fibrine, qui vient renforcer le clou plaquettaire de l'hémostase primaire.

Au final, plus d'une douzaine de protéines interagissent dans une cascade ordonnée d'activations. A chaque étape, un précurseur inactif d'un facteur de coagulation subit une réaction protéolytique limitée et devient lui-même une protéase qui active de la même façon son successeur, jusqu'à la formation ultime de fibrine insoluble. A l'exception des facteurs III, IV, VIIIc, tous les facteurs sont synthétisés par le foie. Parmi eux, quatre sont dits « vitamine K₁ dépendants » (Shearer, 1990) car leur activation terminale nécessite la présence de vitamine K₁ hydroquinone. Il s'agit des facteurs PPSB avec le facteur II (Prothrombine), VII (Proconvertine), IX (la globuline anti-hémophilique B) et X (facteur de Stuart-Prower). L'absence d'activation de ces facteurs de coagulation rend impossible ou ralentit la voie endogène et la voie exogène de la coagulation d'où l'apparition d'hémorragies (Kolf-Clauw *et al.*, 1995 ; Whitlon *et al.*, 1978). La figure 08 récapitule les différentes étapes de l'hémostase secondaire.

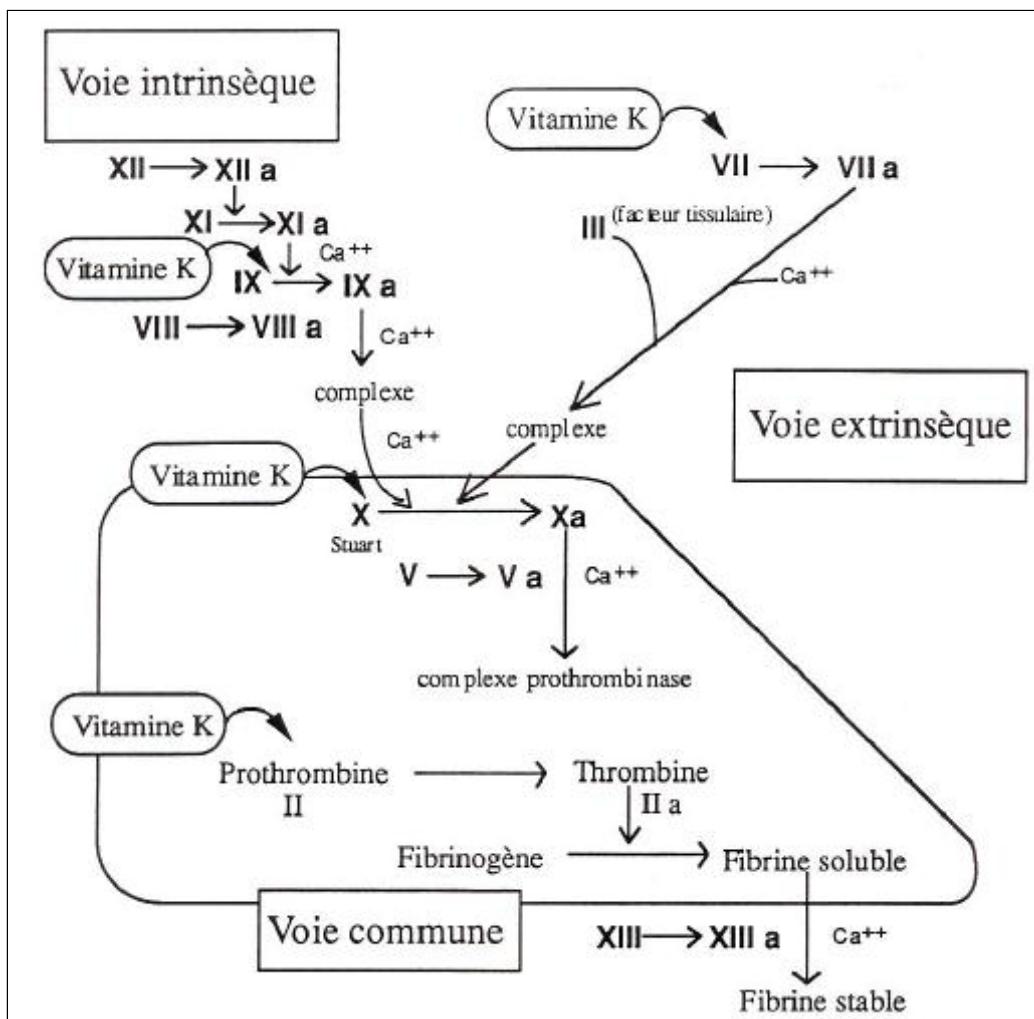


Figure 8 : Schéma récapitulatif de la cascade de coagulation (Buronfosse, 1995)

Les voies extrinsèques et intrinsèques, empruntées pour la mise en place du mécanisme commun de l'hémostase, sont ici distinguées. Les facteurs activés sont symbolisés par le numéro du facteur suivi de la lettre « a » (Vermeer, 1984).

c. La fibrinolyse

La fibrinolyse est un phénomène physiologique normal faisant intervenir là aussi des facteurs plasmatiques consistant à dégrader la fibrine insoluble lorsque le vaisseau est réparé. Elle fait intervenir une enzyme très puissante, la plasmine (Berten, 1995) et aboutissant à la lyse du caillot et à la restitution *ad integrum* de la paroi vasculaire.

La production des facteurs de la coagulation « vitamine K dépendant » est donc incontournable afin que le mécanisme de la coagulation puisse se mettre en place correctement. Le cycle de la vitamine K ainsi que les apports exogènes de la vitamine K sont de ce fait indispensables à l'équilibre hémostatique ainsi qu'au bon fonctionnement général de l'organisme. Il s'agit d'une cascade enzymatique complexe, dont l'absence d'un seul facteur entraîne de graves perturbations. Sans cesse mise à contribution pour la réparation du système vasculaire, une défaillance s'avère rapidement létale. La figure 9 récapitule les étapes de l'hémostase secondaire et de la fibrinolyse.

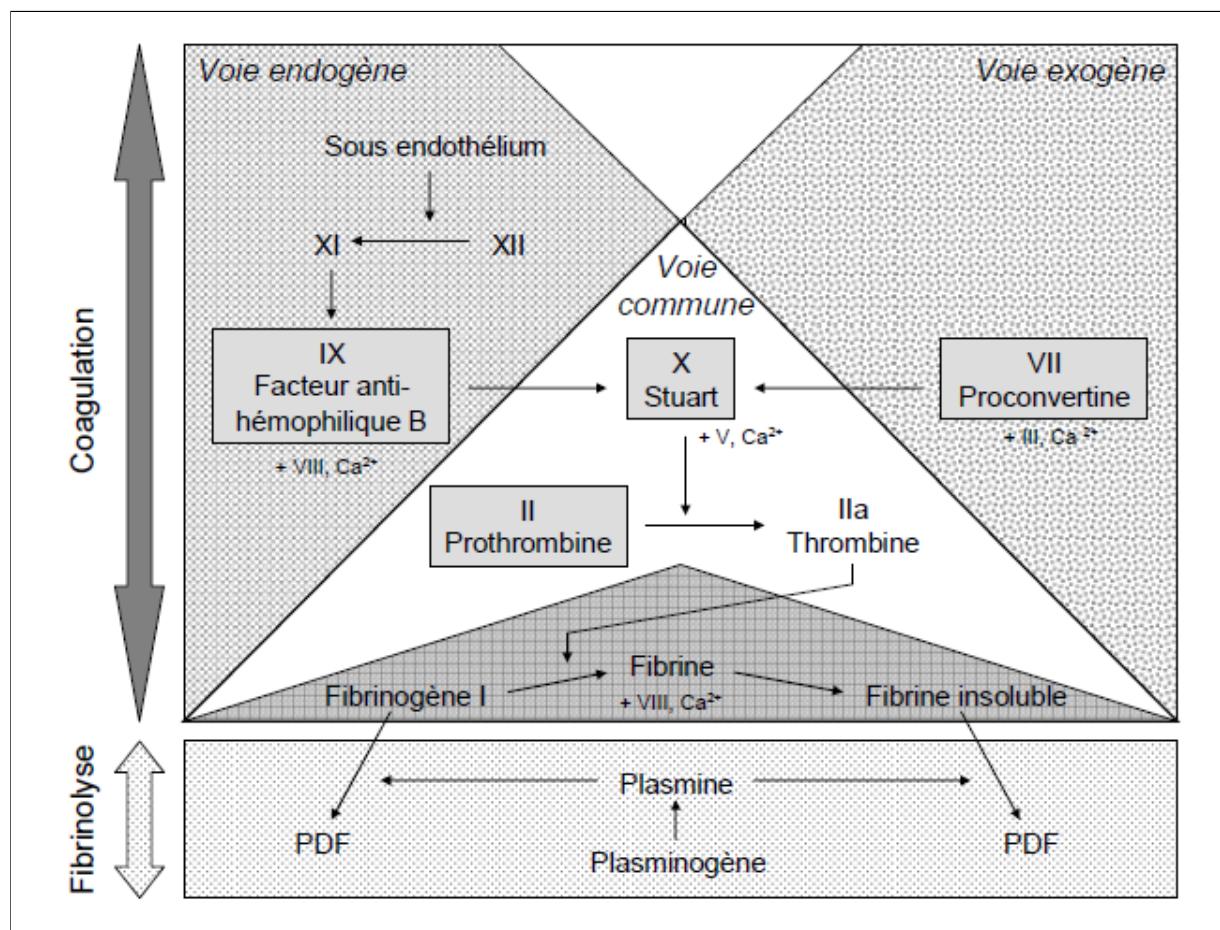


Figure 9 : Hémostase secondaire (Kolf-Clauw *et al.*, 1995)

I.6.2. Vitamine K

La vitamine K₁ est un cofacteur obligatoire pour l'activation terminale des facteurs PPSB. Ses propriétés sont ici décrites avant d'expliquer son rôle dans la coagulation plasmatique.

a. La famille des vitamines K

Historiquement, H. DAM découvre en 1929 une substance liposoluble dont la carence chez le poulet provoque en quelques semaines un syndrome hémorragique secondaire à une diminution du taux plasmatique de prothrombine. Il donne le nom de vitamine K à ce composé, pour « Koagulation Vitamin ». Par la suite, plusieurs composés possédant cette activité vitaminique K sont isolés, identifiés et synthétisés. Ils sont d'origines naturelles pour les vitamines K₁ et K₂ ou synthétiques pour les vitamines K₃ et K₄.

La vitamine K₁ est également appelée phylloquinone, phytoménadione, ou phytonadione. Elle se trouve concentrée au niveau des chloroplastes et des huiles végétales.

Au sein de notre alimentation, elle est particulièrement présente dans certains légumes verts tels les épinards, les brocolis ou les choux. La synthèse naturelle de vitamine K₁ produit de façon équivalente les deux isomères, cis et trans, de la molécule. Seul l'isomère trans a une réelle activité hémostatique. Elle est la seule vitamine K utilisable pour le traitement des intoxications aux anticoagulants.

Les ménáquinones sont un groupe de substances soit naturelles soit synthétiques, dans lequel on retrouve la farnoquinone (n = 5) aussi appelée vitamine K₂. La vitamine K₂ est une vitamine naturelle et comme toutes les ménáquinones d'origine naturelle, elle est synthétisée par la flore digestive, plus particulièrement par les bactéries GRAM positif. Les fèces sont ainsi riches en vitamine K et certains animaux coprophages, comme le rat, utilisent cette

source de vitamine K dans leur alimentation. La vitamine K₂ semble être plus facilement assimilable par les rongeurs que la vitamine K₃ (Lasseur, 2006).

La vitamine K₃ ou ménadione® est une molécule synthétique à activité voisine de la phylloquinone. La flore intestinale l'utilise comme une provitamine : elle est transformée en vitamine K₁ par les bactéries par l'ajout d'une chaîne latérale isoprénique.

Lors d'intoxication par les raticides anticoagulants, seule la vitamine K₁ est utilisable et efficace. Les autres vitamines K sont soit non disponibles (vitamine K₂), soit inefficaces (vitamine K₃).

b. Caractéristiques physico-chimiques de la vitamine K₁

La vitamine K₁ est la 2-méthyl-3-phytyl-1,4-naphtoquinone. Sa formule semi développée est la suivante (figure 10) :

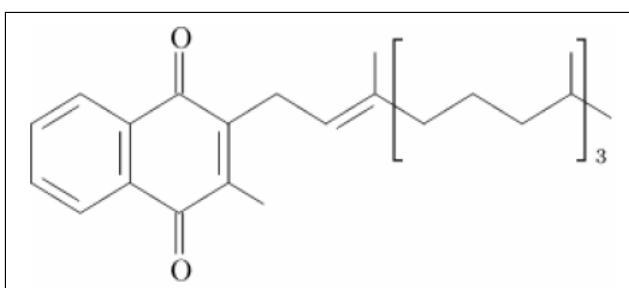


Figure 10 : Formule semi développée de la vitamine K₁

L'activité des vitamines K est liée à la présence d'un noyau méthyl-naphtoquinone substitué par une chaîne poly-isoprénique. Elle est maximale pour une longueur correspondante à 4 ou 6 résidus isopréniques.

D'un point de vue physique, la vitamine K₁ est une huile jaunâtre insoluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques comme l'acétonitrile, l'hexane et les principaux détergents (D.M.S.O., Triton X100). Elle est détruite en présence de lumière.

c. Pharmacocinétique

La vitamine K₁ est une molécule liposoluble qui ne peut être absorbée, par voie digestive, qu'en présence de sels biliaires et d'enzymes pancréatiques. Son absorption s'effectue principalement au niveau de la région proximale de l'intestin grêle, par un transporteur saturable, énergie-dépendant. Elle passe ensuite par voie lymphatique par l'intermédiaire des chylifères. En général, la quantité de vitamine K₁ absorbée est importante : elle représente au moins 50 % des besoins quotidiens. La flore microbienne intestinale en assure en grande partie la synthèse. Cependant il peut exister une grande variabilité individuelle, avec par exemple une diminution de l'absorption lors d'insuffisance pancréatique ou d'obstruction biliaire. Dans ces cas, des formes hydrosolubles dérivées des ménadiolones peuvent être utilisées, car leur absorption peut s'effectuer en l'absence de sels biliaires.

Après avoir été absorbée, la vitamine K₁ se concentre d'abord dans le foie, où sa concentration diminue rapidement. Au niveau hépatique, seule une partie de la vitamine K₁ entre dans le cycle de réactions associé à la synthèse des facteurs II, VII, IX et X. Très peu de vitamine K₁ se stocke dans les autres tissus. Globalement, la vitamine K est très peu stockée dans l'organisme dans la mesure où son catabolisme est très intense. Sa demi-vie est d'environ 2 heures. L'excès de vitamine K₁ est rapidement métabolisé et éliminé par voie biliaire : les glucurononoconjugués sont déconjugués puis estérifiés au cours de leur passage dans la lumière intestinale. Lors d'injection intraveineuse, pratiquement un cinquième de la vitamine K₁ administrée est éliminée dans les urines sous forme de glucurononoconjugués. Enfin pendant la lactation, la vitamine K₁ est très faiblement distribuée dans le lait, ce qui implique de traiter individuellement la portée lors d'intoxication.

d. Cycle de la vitamine K₁

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

• Activation des facteurs PPSB

Les précurseurs protéiques des facteurs PPSB, acarboxylés et inactifs (Wallin et Hutson, 2004), sont synthétisés au niveau des ribosomes des hépatocytes. Ces composés sont des glycoprotéines possédant plusieurs séquences glutamyl. Ils subissent des carboxylations dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. Leur point commun remarquable est alors la présence d'un acide glutamique terminal (Lasseur, 2006). L'activation des précurseurs PPSB correspond à la gamma-carboxylation de leur acide glutamique terminal. Par un propeptide terminal de reconnaissance, ils sont identifiés et captés par une γ -carboxylase, située sur la face lumineuse du réticulum endoplasmique granuleux des hépatocytes. La γ -carboxylase est liée à une autre enzyme, une époxydase. Sans réel couplage, la réaction de γ -carboxylation post-traductionnelle des résidus glutamate des facteurs de coagulation pour les transformer en acides γ -carboxy-glutamiques qui seront actifs nécessite la vitamine K₁ hydroquinone, qui est alors oxydée en vitamine K 2,3-époxyde. Les dérivés carboxylés obtenus sont les facteurs activés de la coagulation II, VII, IX et X présents dans le sang. Ces résidus sont des diacides de types [R-C-(COOH)₂] capables de chélater le calcium divalent qui leur permettent d'adhérer aux plaquettes via leurs phospholipides membranaires en formant des ponts dicalciques, et participer à la coagulation sanguine. Sans cette adhésion aux plaquettes, la cascade de la coagulation serait très faible car l'activation des proenzymes en enzymes est très lente. En effet, l'adhésion des facteurs de la coagulation aux plaquettes

concentre les activités enzymatiques, ce qui permet l'amplification phénoménale du signal moléculaire initial. Sans activation massive de ces proenzymes, la formation du caillot serait trop lente pour colmater une brèche vasculaire (Wallin et Huston, 2004). Cette carboxylation s'effectue en présence d'oxygène, de dioxyde de carbone et de vitamine K réduite (KH2).

- **Régénération de la vitamine K₁**

Pour continuer à maintenir un taux de production en facteurs PPSB compatible avec une coagulation sanguine normale, la vitamine K₁ hydroquinone doit être régénérée. C'est le rôle du cycle de la vitamine K, représenté schématiquement ci-dessous (figure 11).

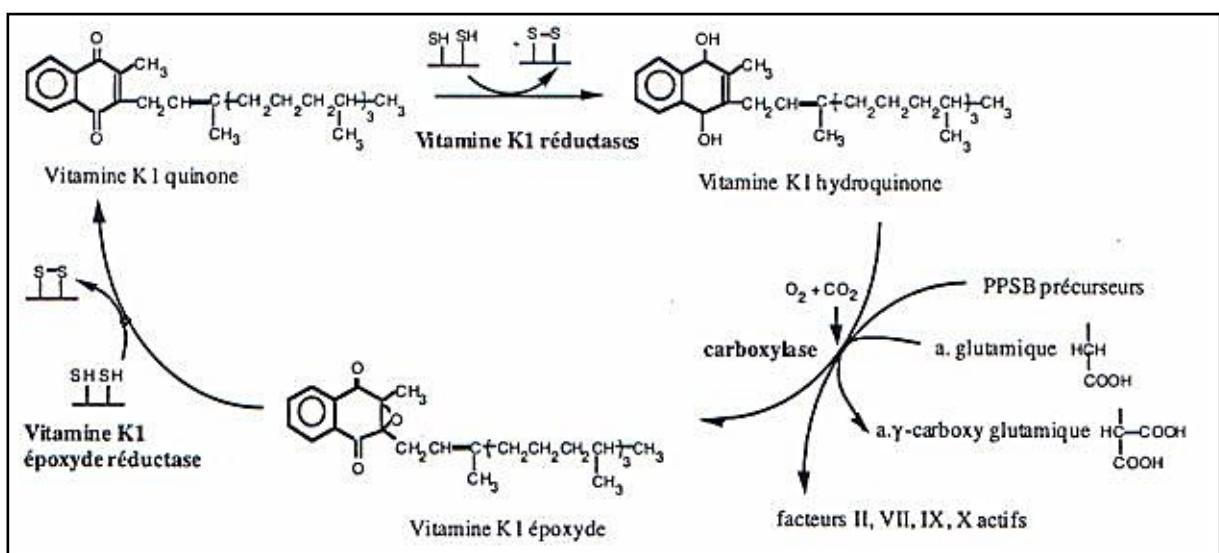


Figure 11 : Régénération de la vitamine K₁ (Rossi, 2004 ; Voils, 2007)

La vitamine K réduite est oxydée au cours de la réaction (figure 11). La quantité de vitamine K apportée par l'alimentation étant limitée, il est impératif de recycler cette vitamine K époxyde en vitamine K réduite et c'est cette réaction qu'accomplit la vitamine K époxyde réductase. La gamma-carboxylation des précurseurs des facteurs PPSB nécessite la présence d'oxygène moléculaire, de bicarbonates et de vitamine K (Lin *et al.*, 2002 ;

Presnell et Stafford, 2002 ; Furie et Furie, 1990). La seule forme active de la vitamine K pour l'activation des facteurs PPSB est la vitamine K₁ hydroquinone. Au cours du cycle de la vitamine K, la phylloquinone, forme ingérée de la vitamine K₁, est dans un premier temps réduite par une ou plusieurs réductases spécifiques en vitamine K₁ hydroquinone. Lors de la réaction de γ -carboxylation, la vitamine K₁ hydroquinone est oxydée en vitamine K 2,3-époxyde par une époxydase, située à 80 % dans le réticulum endoplasmique granuleux du foie. Ensuite, l'époxyde est très rapidement réduit en phylloquinone par la vitamine K₁ époxyde réductase. Il s'agit d'une macroprotéine constituée de 4 sous-unités dont une glutathion S-transférase et une époxyde-hydrolase, et située dans des proportions comparables au niveau des réticulums endoplasmiques lisses et granuleux. La vitamine K₁ se trouve ainsi régénérée. Du fait de ces réactions en boucle, le stock constitutif de vitamine K₁ dans l'organisme est très faible dans les conditions physiologiques. L'absence de régénération de la vitamine K aboutit donc rapidement à l'arrêt de la synthèse des facteurs PPSB et de ce fait, à des troubles de l'hémostase secondaire. C'est précisément le mécanisme d'action biochimique des raticides anticoagulants (Rossi, 2004 ; Voils, 2007).

I.6.3. Action toxique des anticoagulants

Les perturbations hémostatiques causées par les anticoagulants sont dues à un blocage du cycle de la vitamine K₁.

❖ Blocage du cycle de la vitamine K

Les raticides anticoagulants présentent une analogie structurale avec le noyau naphtoquinone de la vitamine K. Toutes les enzymes du cycle de la vitamine K peuvent ainsi être inhibées pharmacologiquement, mais seules les vitamines K réductases et l'époxyde réductase le sont efficacement *in vivo*, chez l'animal comme chez l'homme.

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

Les anticoagulants dont le Brodifacoum sont des inhibiteurs de ce complexe enzymatique et bloquent ainsi le cycle de la Vitamine K. En présence d'anticoagulants, les facteurs de coagulation ne peuvent plus être carboxylés ce qui rend leur activation impossible. Ils sont toujours synthétisés mais la concentration plasmatique de leur forme active diminue. L'absence de γ -carboxylation fait perdre aux cinq proenzymes de la cascade de la coagulation leur capacité d'adhérer à la surface des plaquettes sanguines. Par conséquent, la coagulation est perturbée voire stoppée lorsque les stocks de vitamine K réduite et de facteurs de coagulation activés de l'organisme sont épuisés. La demi-vie de ces facteurs varie de 8 à 45 heures expliquant une apparition des symptômes hémorragiques différée par rapport à l'ingestion. Les microlésions capillaires provoquent des hémorragies qui en raison de l'absence de prothrombine, ne s'arrêtent jamais. L'animal meurt alors des suites d'hémorragies entre 2 et 10 jours après l'ingestion du produit (Grolleau *et al.*, 1989 ; USEPA, 1998) (figure 12).

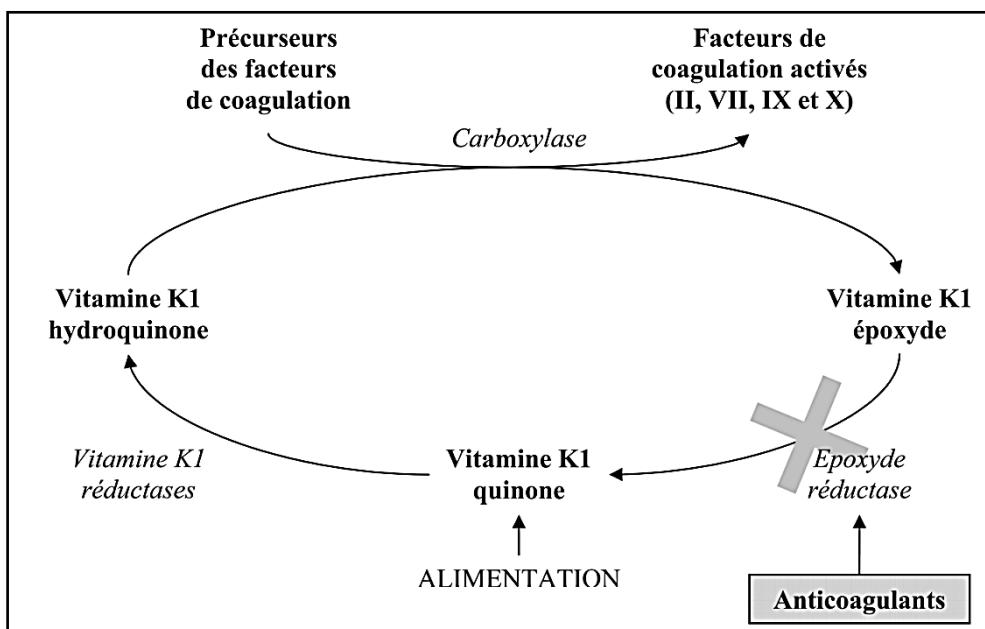


Figure 12 : Cycle de la vitamine K₁ (Cloet-Chabre, 1998)

La réduction de la vitamine K₁ quinone peut emprunter la voie de la quinone réductase, inhibée par les anticoagulants et largement prépondérante, ou la voie des déshydrogénases nicotinamide dépendantes, beaucoup moins affectée par les dérivés coumariniques. Cette dernière est constituée d'une DT-diaphorase, sensible aux anticoagulants avec préférentiellement un blocage de la NADH réductase (Nicotinamide adénine dinucléotide), et d'une déshydrogénase microsomale, insensible au Coumafène et qui constituerait une voie de passage de l'effet antidotique de la vitamine K dans les intoxications aux anticoagulants (Lasseur, 2006).

L'inhibition par les anticoagulants des 3 principales enzymes impliquées dans le cycle de la vitamine K a été mesurée pour le Coumafène, le Flocoumafène, le Difénacoum et le Brodifacoum (Rossi, 2004). Ces études ont été réalisées à partir d'enzymes appartenant à 3 espèces : rat, bovin et humain. Pour ces 3 espèces, la concentration nécessaire pour inhiber 50 % des enzymes est comparable pour la vitamine K quinone réductase et la vitamine K 2,3-époxyde réductase, tandis qu'elle est 2 à 3 fois plus élevée pour la carboxylase réductase. De plus, aucune particularité spécifique n'a pu être mise en évidence quant à l'inhibition des enzymes par les anticoagulants (tableau 8).

Tableau 8 : Conditions d'activation et d'inhibition des enzymes participant à la régénération de la vitamine K réduite (Sachot, 2000 ; Lasseur, 2006)

Enzyme	Activation	Inhibition
Epoxyde réductase		Par les AVK à dose modérée
NADH réductase (quinone réductase)		Par les AVK à dose modérée
Vitamine K déshydrogénase (carboxylase réductase)	Avec une forte dose de vitamine K	Par les AVK à dose élevée

Au final, l'action des anticoagulants est ciblée contre la réduction de la vitamine K₁ en vitamine K₁ hydroquinone, la seule forme active. *In vivo*, l'inhibition de l'époxyde réductase est majoritaire. La quinone réductase est également sensible aux anticoagulants, mais son inhibition *in vivo* semble compensée par les autres enzymes réductrices de la vitamine K₁ quinone. Ces taux variables d'inhibition enzymatique influencent le traitement antidotique. Chez l'homme par exemple, l'ingestion d'anticoagulant est le plus souvent modérée : seule l'époxyde réductase est alors inhibée. L'apport thérapeutique de vitamine K₁ peut être très faible (souvent moins de 0,5 mg/kg/j) pendant tout le traitement. A l'inverse, les doses de vitamines K₁ chez les carnivores domestiques sont beaucoup plus élevées, car on considère que l'ingestion d'anticoagulants a pu être massive, entraînant l'inhibition de la NADH réductase. Une posologie élevée en vitamine K₁ (5 mg/kg/j) rend possible l'activation de la vitamine K déshydrogénase, d'où une synthèse accélérée de la vitamine K réduite et donc de facteurs PPSB.

I.7. Produit utilisé

Le produit utilisé dans ce travail est le Brodifacoum, l'un des raticides les plus largement employés dans le monde entier. Il a été appliqué depuis les années 90 pour contrôler les rongeurs. Son nom chimique est : 3-[3-(4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-4-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one (O' Neil, 2001). Brodifacoum est le nom commun approuvé. Talon® et Klerat® sont des noms commerciaux. Il est utilisé dans les appâts de céréales dans des stations d'amorce. En janvier 2000 le département de la conservation a annoncé des plans pour réduire l'utilisation du Brodifacoum sur le terrain. Le Brodifacoum peut persister (> 1 an) dans le foie et les reins. Il est donc important que le risque de contamination de la faune soit identifié. Le produit doit être employé avec

précaution pour réduire au minimum la contamination des animaux non-cibles (Eason et Wickstrom, 2001).

I.7.1. Propriétés physico-chimiques

La formule chimique du Brodifacoum est : $\text{CH}_3\text{Br}_{23}\text{O}_3$, et le poids moléculaire est de 523,4.

La poudre du Brodifacoum est inodore et insipide, d'une couleur grisâtre, avec un point de fusion de 228-232 °C. Il est d'une très faible solubilité dans l'eau (moins de 10 mg/L à 20 °C et pH 7). Il est légèrement soluble dans les alcools et le benzène et soluble dans l'acétone. Il est stable à la température ambiante. Les solutions concentrées commerciales du Brodifacoum sont disponibles pour des fabricants d'appâts (Eason et Wickstrom, 2001).

I.7.2. Historique et utilisation

Le Brodifacoum est un composé synthétique qui a été développé il y a quelques décennies. Il est structurellement lié à une coumarine naturelle qui cause des syndromes hémorragiques chez les bovins mangeant le mélilot moisi ou mal séché. Les propriétés rodenticidales du Brodifacoum ont été décrites au début des années 70. Il s'agit d'un anticoagulant puissant très actif contre les rats et les souris, y compris les souches résistantes à la Warfarine et d'autres anticoagulants (Rennison et Hadler, 1975). Une ingestion unique de 1 mg/kg est habituellement suffisante pour tuer. En Nouvelle-Zélande, il est principalement utilisé pour contrôler les rongeurs (Williams *et al.*, 1986). En raison de la tendance à une exposition non contrôlée des animaux non-cibles par l'empoisonnement secondaire (Boermans *et al.*, 1991 ; Eason *et al.*, 1999a, 2002), la pratique suggérée de l'empoisonnement secondaire des hermines (Brown *et al.*, 1998) n'est pas recommandée, en particulier dans les zones où les gibiers peuvent être chassés pour la consommation humaine. Le Brodifacoum a été utilisé

avec succès dans des programmes récents d'éradication des rongeurs sur les îles de la Nouvelle-Zélande pour protéger les populations d'oiseaux indigènes menacées (Taylor et Thomas, 1989, 1993 ; Buckle et Fenn, 1992 ; Robertson *et al.*, 1993 ; Towns *et al.*, 1993). En plus de son utilisation pour contrôler et éradiquer les rats, le Brodifacoum a été utilisé avec succès pour contrôler les lapins (Merton, 1987 ; Towns *et al.*, 1993), les wallabies et les opossums brushtail (Eason *et al.*, 1993). L'utilisation des appâts contenant du Brodifacoum sur les champs pour le contrôle des lapins ou des wallabies a été interrompue en Nouvelle-Zélande.

I.7.3. Devenir dans l'environnement

Le Brodifacoum est le plus peu susceptible d'être trouvé dans l'eau même après l'application aérienne des appâts pour la commande des rongeurs sur les îles. Le Brodifacoum n'est pas mobile dans le sol et est extrêmement insoluble dans l'eau (< 10 mg/L d'eau à pH 7). Lorsque les appâts se désintègrent, le Brodifacoum sera susceptible de rester dans le sol, où il sera dégradé lentement par les micro-organismes. La demi-vie dans le sol varie de 12 à 25 semaines en fonction de la nature du sol. La dégradation microbienne dépendra des facteurs climatiques tels que la température et la présence d'espèces capables de dégrader le Brodifacoum. Lorsque les appâts se désagrègent, le Brodifacoum reste absorbé dans le sol et seulement l'érosion du sol lui-même peut montrer toute quantité de Brodifacoum dans l'eau contaminée. De même, le Brodifacoum est susceptible de rester lié à la matière organique et se dépose dans les sédiments. Si les appâts ont été semés directement dans les ruisseaux ou les rivières, la contamination localisée à court terme pourrait se produire (Eason et Wickstrom, 2001).

I.7.4. Toxicologie et pathologie

- **Apparition des symptômes**

La période latente entre le moment de l'ingestion et l'apparition des signes cliniques varie considérablement et peut prendre de 1 à 4 semaines (Littin *et al.*, 2000). Chez le rat, l'apparition des symptômes et la mort se produit habituellement dans une semaine. Les signes cliniques reflètent certaines manifestations hémorragiques. L'apparition des signes peut se manifester soudainement ; cela est particulièrement vrai lorsque l'hémorragie du système vasculaire cérébral ou péricarde se produit. Les signes cliniques sont souvent une anémie et une faiblesse. L'hémorragie peut être visible autour du nez, de la bouche, des yeux et l'anus des mammifères. Les articulations gonflées et tendres sont communs et si l'hémorragie implique le cerveau ou le système nerveux central, une ataxie ou des convulsions peuvent survenir. Les animaux empoisonnés meurent de causes multiples liées à l'anémie ou au choc hypovolémique. Certains rodents peuvent être moins sensibles aux anticoagulants, cela peut être dû à des différences dans la capacité à métaboliser les xénobiotiques (Olkowski *et al.*, 1998) ou la différence dans les demi-vies des facteurs de coagulation de la vitamine K-dépendants, ou encore de la liaison de la vitamine K aux récepteurs d'époxyde réductase (Eason et Wickstrom, 2001).

- **Mode d'action**

Le Brodifacoum, comme d'autres raticides anticoagulants, agit en interférant avec la synthèse normale des facteurs de coagulation de la vitamine K-dépendants dans le foie des vertébrés (Hadler et Shadbolt, 1975). Dans les hépatocytes, la vitamine K_{1-2,3} époxyde qui est biologiquement inactive est réduite par une enzyme microsomale en vitamine K biologiquement active, qui est essentielle pour la synthèse de la prothrombine et d'autres

facteurs de coagulation (VII, IX et X). L'antagonisme du Brodifacoum avec l'enzyme vitamine K₁-époxyde réductase dans le foie provoque un épuisement progressif de la forme active de la vitamine, et par conséquent des facteurs de coagulation de la vitamine K-dépendants, qui se traduit par une augmentation du temps de coagulation du sang jusqu'à ce que le point où aucune coagulation ne se produit. La plus grande puissance des anticoagulants de la seconde génération tels que le Brodifacoum par rapport à ceux de la première génération tels que la Warfarine et le Pindone est susceptible d'être liée à leur plus grande affinité pour la vitamine K-époxyde réductase et l'accumulation subséquente et la persistance dans le foie et les reins après absorption (Huckle *et al.*, 1988). Les anticoagulants partagent ce site de liaison commun, mais les anticoagulants de la seconde génération ont une plus grande affinité que les composés de la première génération (Parmar *et al.*, 1987). Tous les tissus contenant de la vitamine K-époxyde réductase (par exemple le foie, le rein et le pancréas) sont des organes cibles pour l'accumulation de ces substances toxiques (Eason et Wickstrom, 2001).

• Pathologie et toxicologie

L'hémorragie post-mortem est souvent évidente. Les zones généralement affectées sont la cavité thoracique, le tissu sous-cutané, l'estomac et l'intestin. Le cœur devient parfois arrondi et flasque après des hémorragies sous-épicardiques et sous-endocardiques. L'analyse histomorphologique du foie peut révéler la nécrose centro-lobulaire en raison de l'anémie et l'hypoxie. Le Brodifacoum cause une légère irritation de la peau et une irritation modérée des yeux chez le lapin. De diverses études *in vitro* et *in vivo* (y compris le test de mutation inverse de la *Salmonella*, le test de mutation directe en utilisant des cellules de lymphomes de souris et le test du micronoyau chez la souris) ont été prises pour évaluer le potentiel génotoxique du Brodifacoum. Aucune activité mutagène n'a été détectée. Le Brodifacoum, lorsqu'il est

administré par gavage à des rats femelles à des doses quotidiennes de 0,001, 0,01, ou 0,02 mg/kg du poids corporel pendant le 6-15 jours de la grossesse, n'a causé aucun effet nocif sur le développement des fœtus. Des doses quotidiennes plus élevées (supérieures à 0,05 mg/kg) ont provoqué un effet anticoagulant chez les femelles, qui a abouti à une forte incidence de l'avortement. Les lapins femelles gestantes ont reçu des doses orales du Brodifacoum par gavage en raison de 0,001, 0,002 ou 0,005 mg/kg du poids corporel par jour à partir du 6^{ème} au 18^{ème} jour de la grossesse. Une forte proportion de décès maternels survient à la suite d'une hémorragie chez les femelles traitées par la dose la plus élevée. Bien que les survivantes aient montré des signes hémorragiques, il n'y avait pas d'effets sur le développement des fœtus. En basant sur ces études, le Brodifacoum peut être classé comme non mutagène et manque de potentiel tératogénique (Eason et Wickstrom, 2001).

- **Devenir chez les animaux**

L'absorption, le métabolisme et l'excrétion du Brodifacoum sont comparés avec d'autres anticoagulants. Le Brodifacoum est absorbé par le tractus gastro-intestinal. Il peut être également absorbé par la peau (Spiller *et al.*, 2003) (tableau 9).

Tableau 9 : Toxicité aigüe (DL₅₀ mg/kg) du Brodifacoum chez les rats (Hone et Mulligan, 1982).

Voie d'administration	DL ₅₀ (mg/kg)
Rat (voie orale)	0,27
Rat (voie cutanée)	50,00

Après absorption, des concentrations élevées dans le foie sont rapidement mises en place et restent relativement constantes. La disparition des résidus du Brodifacoum du sérum est lente avec une demi-vie de 156 heures ou plus chez le rat. La lente disparition du plasma et du foie et le grand rapport foie-sérum contribue probablement à une toxicité élevée de Brodifacoum par rapport à la Warfarine ou le Pindone (Bachmann et Sullivan, 1983). Il est évident que la proportion de n'importe quelle dose ingérée de Brodifacoum liée au foie, au rein ou au pancréas reste sous une forme stable pendant un certain temps puis elle sera éliminée très lentement. Contrairement au Brodifacoum, la Warfarine subira un métabolisme relativement étendu. Les métabolites seront plus polaire (hydrosoluble) que la molécule elle-même, et donc plus aisément excrétés dans l'urine. Le Brodifacoum, comme d'autres anticoagulants de la deuxième génération, n'est pas facilement métabolisé et la principale voie d'excrétion du composé non lié est par les fèces. Le cycle entéro-hépatique, le processus qui permet aux médicaments et des pesticides qui ont été absorbés pour revenir à l'appareil gastro-intestinal par le foie via les voies biliaires, joue sans doute un rôle important (Eason et Wickstrom, 2001 ; Huguet, 1998).

Les tableaux 10 et 11 présentent des informations comparatives sur la persistance des anticoagulants. Kelly et O'Malley (1979) ont rapporté que la demi-vie moyenne de la disparition de la Warfarine du plasma des êtres humains volontaires ayant reçu une dose orale unique de 0,5 à 100 mg/kg du poids corporel varie de 24 à 58 heures. Aucun effet dose-dépendant sur la demi-vie n'était évident, même sur cette large gamme de doses. Les anticoagulants de la seconde génération sont beaucoup plus lentement éliminés de la circulation sanguine. Dans une étude comparative chez le lapin, Breckenridge *et al.* (1985) ont rapporté que la demi-vie d'élimination du plasma est de 5,6 heures pour la Warfarine, 83,1 heures pour le Difénacoum et de 60,8 heures pour le Brodifacoum.

Tableau 10 : Persistance des raticides anticoagulants de la première génération.

	Espèce	Sang $t^{1/2}$ *	Rétention du foie **	Références
		(heures)	(jours)	
Warfarine	Rat, souris	18,28	-	Pyrola, 1968
	Lapin	6	-	Breckenridge <i>et al.</i> , 1985
	Opossum	12	-	Eason <i>et al.</i> , 1999a
	Etre humain	15-58	-	O'Reilly <i>et al.</i> , 1963
	Porc	-	30-40	O'Brien <i>et al.</i> , 1987
Pindone	Chien	120	-	Fitzek, 1978
	Mouton	-	8-16	Nelson et Hickling, 1994
Coumatétralyl	Rat	-	$t^{1/2}$ 55	Parmar <i>et al.</i> , 1987
Diphacinone	Bétail	-	> 90	Bullard <i>et al.</i> , 1976

* $t^{1/2}$ pour le plasma ou le foie : c'est la demi-vie d'élimination. C'est la convention pour rapporter l'élimination $t^{1/2}$ de la phase b au lieu de la phase a.

** La rétention hépatique est exprimée comme étant la période de temps pour laquelle les résidus sont rapportés à persister dans le foie à moins que la valeur soit précédée par $t^{1/2}$.

Tableau 11 : Persistance des raticides anticoagulants de la deuxième génération.

	Espèce	Sang $t^{1/2}*$ (heures)	Rétention du foie ** (jours)	Références
Difénacoum	Rat	-	$t^{1/2}$ 118	Bratt, 1987
	Rat	-	$t^{1/2}$ 120	Parmar <i>et al.</i> , 1987
	Lapin	83	-	Breckenridge <i>et al.</i> , 1985
Bromadiolone	Rat	26-57	-	Kamil, 1987
	Rat	25-26	256	Parmar <i>et al.</i> , 1987
	Mouton	-	$t^{1/2}$ 170	Nelson et Hickling, 1994
Flocoumafène	Rat	-	$t^{1/2}$ 220	Huckle <i>et al.</i> , 1989
	Mouton	-	> 128	Nelson et Hickling, 1994
	Caille	-	$t^{1/2}$ 155	Huckle et Warburton, 1989
	Chouette	-	> 100	Newton <i>et al.</i> , 1990
	effraie Chien	-	> 300	Veenstra <i>et al.</i> , 1991
Brodifacoum	Rat	156	> 80	Bachmann et Sullivan, 1983
	Rat	-	$t^{1/2}$ 130	Parmar <i>et al.</i> , 1987
	Lapin	60	-	Breckenridge <i>et al.</i> , 1985
	Chien	6 jours	-	Woody <i>et al.</i> , 1992
	Chien	0,9-4,7 jours (2,8 en moyenne)	-	Robben <i>et al.</i> , 1998
	Opossum	20-30 jours	> 252	Eason <i>et al.</i> , 1996a, b
	Mouton	-	> 250	Laas <i>et al.</i> , 1985
	Etre Humain	16-36	-	Weitzel <i>et al.</i> , 1990
Diféthialone	Rat	2,5 jours	$t^{1/2}$ 108 [§]	Lechevin et Poche, 1988
	Chien	2,2-3,2 jours	-	Robben <i>et al.</i> , 1998

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

* $t_{1/2}$ pour le plasma ou le foie : c'est la demi-vie d'élimination. C'est la convention standard pour rapporter l'élimination $t_{1/2}$ de la phase b au lieu de la phase a.

** La rétention hépatique est exprimée comme étant la période de temps pour laquelle les résidus sont rapportés à persister dans le foie à moins que la valeur soit précédée par $t_{1/2}$.

§ La demi-vie d'élimination hépatique de la Diféthialone rapporté par Lechevin et Poche (1988) est particulièrement courte pour un anticoagulant de la deuxième génération, ce qui suggère que la Diféthialone peut être unique.

Il existe très peu de données sur l'influence de la dose sur l'élimination. Cependant, dans le cas de la Bromadiolone, une augmentation de la dose-dépendante de la demi-vie d'élimination plasmatique de 25,7 à 57,5 heures, a été rapportée après une administration orale progressive de 0,8 à 3 mg/kg chez le rat (Kamil, 1987). Woody *et al.* (1992) ont observé une demi-vie d'élimination pour le Brodifacoum dans le sérum de 6 ± 4 jours chez quatre chiens. La demi-vie plasmatique du Brodifacoum déterminée dans trois patients atteints des troubles sévères de coagulation a été trouvée à environ 16-36 jours (Weitzel *et al.*, 1990). Il existe très peu de données sur la persistance de la Warfarine ou le Pindone dans le foie des animaux. Deux études sur des espèces non-rodents indiquent relativement une clairance rapide par le foie. Les concentrations de la Warfarine ont diminué chez les porcs à très faibles concentrations après environ 30 jours, et les concentrations ont diminué dans ceux qui ont reçu une dose létale et ceux qui ont survécu (O'Brien *et al.*, 1987). Chez les moutons recevant des doses sub-létales de Bromadiolone (2 mg/kg), Flocoumafène (0,2 mg/kg) et Pindone (10 mg/kg), la Bromadiolone a été détectée dans le foie pendant 256 jours et le Flocoumafène pendant 128 jours. En revanche, le Pindone était indétectable dans le foie après 16 jours (Nelson et Hickling, 1994). Le Diphacinone, qui est un proche parent du Pindone, semble avoir un profil de persistance hépatique plus proche à celui des anticoagulants de la seconde

génération. Chez les bovins recevant une injection unique de 1 mg/kg, des concentrations de résidus presque constantes ont été trouvées dans le foie et les reins, 30, 60 et 90 jours après l'administration (Bullard *et al.*, 1976). Il est à noter que dans les études de persistance, et dans l'évaluation des risques, une considération limitée a été donné aux organes autres que le foie. Ceci est surprenant étant donné que des concentrations très élevées des anticoagulants se trouvent dans les reins et les poumons par rapport à d'autres tissus après le dosage. Le Brodifacoum a été détecté dans le foie des moutons 128 jours après l'administration par voie orale (0,2 et 2,0 mg/kg du poids corporel) à des concentrations de 0,64 à 1,07 mg/kg du poids corporel, respectivement. Les concentrations les plus élevées qui ont eu lieu à 2 jours dans le groupe à forte dose et à 8 jours dans le groupe à faible dose, étaient de 6,50 et 1,87 mg/kg du poids corporel, respectivement (Laas *et al.*, 1985). Parmar *et al.* (1987) ont constaté que l'élimination du Brodifacoum radio-marqué, de la Bromadiolone et du Difénacoum à partir du foie de rat est biphasique, se composant d'une phase initiale rapide d'une durée de 2 à 8 jours après l'administration et une phase terminale plus lente où les demi-vies étaient de 130, 170 et 120 jours, respectivement. L'élimination du Coumatétralyl a été plus rapide, avec une demi-vie de 55 jours. Des résultats similaires ont été trouvés pour le Difénacoum par Bratt (1987). Après une dose unique de 1,2 mg/kg du poids corporel de C-Difénacoum par voie orale, la concentration la plus élevée de la radioactivité (41,5 % de la dose) a été trouvée dans le foie de rat 24 heures après l'administration. L'élimination par le foie est biphasique. La demi-vie d'élimination de la radioactivité au cours de la première phase est rapide était de 3 jours, et pour la phase la plus lente était de 118 jours. Une élimination biphasique similaire est également apparue dans le rein. Dans le pancréas la concentration a diminué plus lentement que dans l'un des autres tissus (182 jours). Le composé d'origine était le composant majeur dans le foie pendant 24 heures après le dosage (42 %).

Dans une étude chez le weka, le Brodifacoum a persisté pendant environ 1 semaine après l'administration (Morgan *et al.*, 1996).

- **Variation des espèces en réponse au Brodifacoum**

Pour les anticoagulants de la seconde génération comme le Brodifacoum, une seule dose est nécessaire pour induire la mort si la quantité ingérée est suffisante. Le Brodifacoum est extrêmement toxique dans un certain nombre d'espèces animales. La toxicité du Brodifacoum varie selon les espèces de mammifères (tableau 12) et les espèces d'oiseaux (tableau 13). Chez la plupart des mammifères les valeurs de DL_{50} sont de 1 mg/kg ou moins. Certaines valeurs plus élevées sont rapportées chez les moutons et les chiens, mais il y a une grande variabilité dans ces rapports (DL_{50} chez les moutons est de 5 à 25 mg/kg et chez les chiens de 0,25 à 3,56 mg/kg du poids corporel).

Tableau 12 : Toxicité aigüe par voie orale (DL_{50} mg/kg) du Brodifacoum chez les mammifères (Godfrey, 1985 ; Eason *et al.*, 1994 ; Eason et Spurr, 1995).

Espèce	DL_{50} (mg/kg)
Porc	0,1
Opossum	0,17
Lapin	0,2
Chat	0,25-25
Chien	0,25-3,56
Rat	0,27
Souris	0,4
Wallaby de Bennett	1,3
Mouton	5-25

Tableau 13 : Toxicité aigüe par voie orale (DL_{50} mg/kg) du Brodifacoum pour les oiseaux (Godfrey, 1985).

Espèce d'oiseau	DL_{50} (mg/kg)
Goéland dominicain	< 0,75*
Bernache du Canada	< 0,75*
Pukeko	0,95
Merle noir	> 3,0 **
Accenteur mouchet	> 3,0 **
Colin de Californie	3,3
Canard colvert	4,6
Mouette de Buller	< 5,0*
Moineau domestique	> 6,0 **
Zostérops à dos gris	> 6,0 **
Busard de Gould	10,0
Faisan de Colchide	10,0
Tadorne de paradis	> 20,0 **

* Une faible dose testée.

** Une forte dose testée.

Il a été suggéré que les anticoagulants sont peu susceptibles d'affecter les invertébrés, qui ont des systèmes de coagulation du sang différents à ceux des vertébrés (Shirer, 1992), une étude néo-zélandaise a montré que le Brodifacoum manque des propriétés insecticides dans le weta (Morgan *et al.*, 1996). Les petits oiseaux tels que les zostérops à dos gris, les moineaux, les merles noirs et les colins de Californie sont considérés comme plus résistants au Brodifacoum

que certains gros oiseaux comme les goélands dominicains, les bernaches du Canada et le pukeko (Godfrey, 1985). Toutefois, certains grands oiseaux, y compris les busards de Gould, les faisans de Colchide et les tadornes de paradis, sont également relativement résistants.

- **Toxicologie aquatique**

Il existe peu de données sur la toxicité aquatique du Brodifacoum. Dans le cas d'utilisation d'appâts contenant du Brodifacoum étant appliqués directement sur un petit ruisseau, l'empoisonnement des invertébrés aquatiques et les poissons pourraient en résulter. La CE_{50} de *Daphnia magna* (premier stade) est de 1,0 mg/kg après 24 heures d'exposition et de 0,34 mg/kg après 48 heures en utilisant 50 ppm d'appât sous forme granulée. La CL_{50} (24 heures) pour la truite arc-en-ciel est de 0,155 mg/L. Les CL_{50} (96 heures) pour la truite arc-en-ciel et le crapet arlequin sont de 0,05 et 0,165 mg/L, respectivement (OMS, 1995).

I.7.5. Diagnostic et traitement de l'empoisonnement par un anticoagulant

- **Diagnostic de l'empoisonnement des animaux domestiques non-cibles**

Le diagnostic des intoxications des anticoagulants est basé sur l'histoire de l'exposition, les signes cliniques, la réponse au traitement, les analyses de laboratoire, et dans des cas de la mort, les lésions. Les diagnostics différentiels changent selon les espèces concernées, et notamment d'autres causes de l'hémostase (troubles de la coagulation) telles que la thrombocytopénie auto-immune (nombre de plaquettes réduit), une maladie du foie, et un déficit en facteur de coagulation héréditaires comme la maladie de Von Willebrand ou d'hémophilie A (Beasley *et al.*, 1997).

• Les signes cliniques

Bien que dans certains cas, des signes ont été observés dans les 24 heures suivant l'ingestion, il y a habituellement une période de retard de 3 à 5 jours entre l'exposition et l'apparition des signes cliniques de l'anticoagulant. Cette apparition retardée représente le temps nécessaire pour épuiser les réserves hépatiques en vitamine K, et de réduire la concentration des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants inactifs dans le plasma, au point de déficience fonctionnelle. Les premiers signes cliniques d'intoxication des anticoagulant sont généralement caractérisés par la dépression/léthargie et l'anorexie, suivis peu après par l'anémie, dyspnée, intolérance à l'exercice et une hémorragie de nombreux sites, évidemment par : hématémèse (vomissement de sang), épistaxis (sang du nez), hémoptysie (bronchique ou des hémorragies pulmonaires), méléna (selles goudronneuses) et des hématomes à divers endroits. L'hémorragie péri ou intra-articulaire causant des articulations enflées et la boiterie est particulièrement fréquente chez les porcs. L'avortement provoqué par l'hémorragie placentaire a été rapporté chez les bovins. Les convulsions indiquent des saignements dans le système nerveux central. Les animaux éprouvant l'intoxication prolongée peuvent être ictères (jaunisses). Les signes cliniques similaires se produisent chez les humains et comprennent une hématurie, des saignements de gencive et des ecchymoses (Park *et al.*, 1986). Si la perte de sang continue, un souffle cardiaque, un rythme cardiaque irrégulier, une faiblesse des pouls périphériques, une ataxie, des décubitus et coma seront observés. La mort due à l'hypoxie et de choc hypovolémique peut se produire à partir de 48 heures à plusieurs semaines après l'exposition. Les animaux peuvent parfois être retrouvés morts sans signes prémonitoires, surtout si une hémorragie grave se produit dans le système vasculaire cérébral, le péricarde, la cavité abdominale, le médiastin ou le thorax (Murphy et Gerken, 1989 ; Felice et Murphy, 1995).

- **Le diagnostic de laboratoire**

L'évaluation de laboratoire de l'exposition suspecte des anticoagulants chez des animaux domestiques inclut la mesure de l'hématocrite, les paramètres de coagulation et l'analyse des résidus. L'activité des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants (II, VII, IX et X) est généralement mesurée en utilisant une série de tests, y compris le taux de prothrombine (TP), le temps de coagulation activé (ACT) et le temps de l'activé céphaline (TCA). La prolongation anormale du TP est habituellement le premier indicateur d'une coagulopathie induite par les anticoagulants, en raison de l'implication du facteur VII dans la voie de coagulation. Le facteur VII a la plus courte demi-vie des facteurs de vitamine K-dépendants (6,2 heures chez les chiens), et est donc le premier à être appauvri en plasma (Murphy et Gerken, 1989). L'élévation du TP à partir de 2 à 6 fois plus que la normale peut se produire dans les 24 à 48 heures après l'ingestion d'une dose toxique. Elle est suivie quelques heures plus tard par une élévation de la TCA à 2-4 fois des valeurs normales dans les cas d'exposition importante. En général, les changements dans les paramètres du temps de coagulation sont suggestifs d'une exposition aux anticoagulants s'ils sont prolongés au-delà de 25 % des valeurs normales. L'évaluation des paramètres de la coagulation nécessite un échantillon de sang frais, non-hémolysé collecté dans des tubes contenant de citrate de sodium, conservés à 4 °C, et soumis immédiatement. Le diagnostic du laboratoire peut exiger la présence d'un échantillon parallèle provenant d'un animal normal et non exposé de la même espèce pour servir de contrôle. L'apparition et la gravité des signes cliniques d'intoxication des anticoagulants sont généralement liées à une baisse de l'hématocrite, sauf en cas d'hémorragie massive aiguë. Par conséquent, l'évaluation régulière de ce point final est un outil utile pour déterminer le traitement approprié et de surveiller les progrès. Des expositions suspectes d'anticoagulants peuvent souvent être confirmées par l'identification de

laboratoire des résidus de toxique dans le vomi (seulement dans les cas de l'ingestion très récente, avant le début des signes cliniques) ou dans les tissus. L'échantillon post-mortem de choix est le sang entier ou le sérum (les résidus sont liés aux protéines), alors que le foie est le meilleur échantillon post-mortem.

- **La réponse au traitement**

Les coagulopathies induites par les anticoagulants (troubles de la coagulation) peuvent être distinguées des autres types de troubles de la coagulation par la réponse clinique au traitement par l'antidote spécifique, la vitamine K₁. Les tests utilisés pour évaluer le temps de coagulation devraient indiquer une amélioration significative de la capacité de coagulation dans les 12 à 24 heures suivant le début du traitement, et devraient revenir à la normale dans les 36 à 48 heures (Murphy, 1999).

- **Lésions**

Les lésions post-mortem résultant de l'exposition aux raticides anticoagulants se caractérisent grossièrement par une hémorragie généralisée, en particulier dans la cage thoracique ou la cavité abdominale, l'espace médiastinal, les tissus péri-articulaires, les tissus sous-cutanés, l'espace sous-dural et le tube digestif. La mort subite est souvent marquée par un hémotorax massive, un hémopericardium et un œdème pulmonaire. Le cœur est souvent flasque, avec des ecchymoses épicardiques et sous-endocardiques. Une nécrose hépatique centrolobulaire secondaire à une anémie et une hypoxie hépatocellulaire peuvent être observées histologiquement (Osweiler, 1996 ; Beasley *et al.*, 1997).

I.7.6. Les effets sur les animaux non-cibles

Beaucoup d'études s'intéressent à l'étude de l'effets des raticides anticoagulants sur les animaux non-cibles (Newton *et al.*, 1990 ; Robben *et al.*, 1997 ; Sheafor et Couto, 1999 ; Stone *et al.*, 1999, 2003 ; Svendsen *et al.*, 2002 ; Petterino *et al.*, 2004 ; Saravanan et Kanakasabai, 2004). Le Brodifacoum a le potentiel de causer une intoxication à la fois primaire et secondaire des espèces non-cibles (James *et al.*, 1998). Cependant, comme avec les autres pesticides, les effets néfastes du Brodifacoum sur la faune dépendent plus de la façon dont on utilise les appâts et le comportement et la sensibilité des espèces non-cibles face aux toxines. Les appâts dans les stations d'amorces sont moins accessibles pour les espèces non-cibles que les appâts sur les champs. L'intoxication secondaire des oiseaux est probable où les espèces cibles (les rats) sont un constituant majeur de l'alimentation (le busard). En dépit de ces distinctions, une large gamme de petits et de grands oiseaux ont été trouvés morts d'une intoxication primaire ou secondaire après l'utilisation du Brodifacoum sur le terrain : les créadions rounoirs, les merles noirs, les pinsons des arbres, les moineaux domestiquex, les accenteurs mouchets, les zostérops à dos gris, les grives musiciennes, les tadornes de paradis, les cassicans flûteurs, les merles d'Amérique, les râles wekas, les wekas de l'île Stewart et les labbes antarctique (Towns *et al.*, 1993 ; Williams *et al.*, 1986 ; Taylor et Thomas, 1993 ; Taylor, 1984).

Ces résultats suggèrent que les différences signalées dans la sensibilité (les valeurs éditées de la DL_{50} ; voir le tableau 12) peuvent être soit des facteurs prédictifs imprécis ou non pertinents de la susceptibilité au Brodifacoum, car les espèces telles que les moineaux domestiques, dos gris et les tadornes de paradis sont modérément résistants.

L'impact de l'activité toxique du Brodifacoum sur les espèces non-cibles pourraient avoir mangé des appâts a été suivi dans plusieurs études. Trois espèces d'oiseaux indigènes (les râles weka, les wekas de l'île Stewart et le pukeko) ont été sévèrement réduites dans les zones

de poison. Par exemple, la population occidentale entière sur l'île de Tawhitinui a été exterminée par la consommation directe de Talon ® 50WB destiné aux rats des navires. Les rats ont été affectés soit en trainant dans les stations d'appâts, en mangeant des appâts lâchés par des rats, ou aussi en mangeant des rats morts ou mourants (Taylor, 1984). De plus, le décès de certains individus d'autres espèces d'oiseaux a été signalé après 1 mois de la distribution aérienne de Talon ® 20P (Towns *et al.*, 1993 ; Robertson *et al.*, 1993). Des résidus du Brodifacoum ont été détectés chez des oiseaux morts après l'application aérienne d'appâts pour l'éradication des rongeurs (Morgan *et al.*, 1996), mais dans l'ampleur de la contamination de la faune et de l'impact après une utilisation continue n'a pas été largement étudié. Des doses sub-létales de Brodifacoum ont provoqué des avortements et ont réduit les taux de naissance chez les ovins (Godfrey, 1985), et des préoccupations ont été exprimées au sujet des effets néfastes de faibles doses d'anticoagulants sur les chouettes hulottes (Townsend *et al.*, 1981). Néanmoins, il n'y a pas de publications qui élucident les effets potentiels à long terme de l'exposition aux faibles doses de Brodifacoum chez les oiseaux. Il n'existe pas de données publiées des DL₅₀ sur la toxicité aiguë du Brodifacoum aux reptiles, aux amphibiens et aux chauves-souris. Cependant, les reptiles sont connus pour leur sensibilité au Brodifacoum. Les invertébrés ont été vus manger des appâts contenant du Brodifacoum, et des résidus de Brodifacoum ont été trouvés dans les coléoptères recueillis par les stations d'appâts contenant Talon ® 50WB destiné aux rats sur l'île Stewart. Il est considéré que les invertébrés sont peu susceptibles d'être directement tués par le Brodifacoum (Shirer, 1992 ; Morgan *et al.*, 1996). Mais, un certain nombre d'observations non publiées suggèrent que le Brodifacoum peut être toxique pour les mollusques. Les invertébrés contaminés peuvent présenter un risque d'intoxication secondaire pour les vertébrés insectivores (Eason et Wickstrom, 2001).

- **L'intoxication secondaire**

Le risque d'intoxication secondaire pour les espèces non-cibles est beaucoup plus grand avec des anticoagulants de la seconde génération tels que le Brodifacoum que des anticoagulants de la première génération tels que la Warfarine, car les composés de la deuxième génération ne sont pas sensiblement métabolisés et excrétés avant la mort. Par exemple, cinq des six hiboux sont morts après avoir mangé des rats empoisonnés par le Brodifacoum pendant 8 à 11 jours (Mendenhall et Pank, 1980). Le potentiel pour que les invertébrés peuvent intoxiquer les oiseaux a été suggéré (Stephenson *et al.*, 1999). Les risques perçus de l'intoxication secondaire de la faune non-cible ont limité les anticoagulants de la seconde génération tels que le Brodifacoum d'être homologué pour une utilisation sur le terrain dans les Etats-Unis (Colvin *et al.*, 1991). La détection des résidus de Brodifacoum dans une gamme de faune, y compris les oiseaux indigènes tels que le kiwi (*Apteryx spp*) (Robertson *et al.*, 1993), soulève de sérieuses préoccupations au sujet des effets de l'utilisation du Brodifacoum sur le terrain à long terme. Cette situation est aggravée par la détection récente de résidus dans une large gamme d'espèces : weka, ninoxe boubouk, busard de Gould, pukeko, canard gris, canard colvert, goéland marin, merle, créadion rounoir, pinson, mainate, cassican flûteur et merle noir (Murphy *et al.*, 1998 ; Dowding *et al.*, 1999). Néanmoins, en raison du potentiel de contamination incontrôlée de la faune (démontré par les données de l'enquête de terrain), l'utilisation du Brodifacoum sur le terrain à grande échelle en Nouvelle-Zélande (Eason *et al.*, 1999a, 2000a) est actuellement limitée par le ministère de la conservation. De récentes enquêtes de la faune ont indiqué que la contamination étendue s'est produite où il y a eu une utilisation durable du Brodifacoum. Des enquêtes publiées récemment par le département du ministère de la conservation et protection des terres démontrent clairement la contamination répondue de la faune qui s'étend aux oiseaux indigènes ainsi que des

espèces de gibier (Murphy *et al.* 1999 ; Gillies et Pierce, 1999 ; Dowding *et al.* 1999 ; Meenken *et al.* 1999 ; Eason *et al.* 1999a ; Robertson *et al.* 1999 ; Stephenson *et al.* 1999).

Cette tendance se reflète à l'étranger où des raticides anticoagulants de la deuxième génération sont utilisés (Young et De Lai, 1997 ; Shore *et al.* 1999 ; Stone *et al.* 1999). Sur des sites où la persistance du Brodifacoum soulève des inquiétudes au sujet de l'éventuel transfert de ce composé dans la chaîne alimentaire pour les humains, les chiens, ou la faune, une approche des précautions est recommandée (Stephenson, 2000).

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

ÉTUDE
FLUIDE
EXPÉRIMENTALE
EXPERIMENTAL

II. Etude expérimentale

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Matériel

a. Matériel biologique et entretien

Notre étude expérimentale a été réalisée sur le lapin mâle de la souche *Cuniculus lepus*, provenant de la région d'Annaba, car il présente un double intérêt : il s'agit d'une part d'un animal de laboratoire aux caractéristiques biologiques bien connues avec un cycle de reproduction rapide, et d'autre part d'une espèce de rente. Ce sont des mammifères fréquemment utilisés dans les recherches, ils constituent des modèles types pour les études toxicologiques des pesticides. La puberté survient entre le quatrième et le sixième mois après la naissance. Tous les animaux de l'expérimentation étaient pubères.

Dès leur arrivée au laboratoire, les animaux étaient entretenus dans des cages métalliques à raison de 3 animaux par cage. Les cages étaient équipées de boites pour la nourriture. L'abreuvement des animaux est réalisé grâce à des flacons disposés dans un coin de la cage. Les lapins recevaient tous le même aliment complet, sous forme de granulés (aliments secs en cubes) fait essentiellement de maïs, orge, un œuf pour 100 g et une petite quantité de lait en poudre, mélangé au laboratoire à une proportion de 2 mesures de maïs /1 mesure d'orge, en plus des carottes et le pain dur concassé. L'identification de chaque animal est faite au début de chaque expérience. L'animalerie n'était pas climatisée mais, toutes les expérimentations se sont déroulées entre le mois d'Avril et Mai, où la température était aux alentours de 20 et 25 °C en moyenne et l'humidité variait entre 60 et 80 % .

Le traitement par le Brodifacoum débutait après une période d'adaptation de 15 jours.

b. Traitement des lapins

Après la période d'adaptation, les lapins ont été répartis au hasard en quatre groupes de sept (07) lapins, les lapins ont été traités par le Brodifacoum pendant trois (03) semaines comme suit :

Groupe 1 (G1) : le groupe témoin a reçu de l'eau minérale par gavage (*per os*).

Groupe 2 (G2) : les lapins ont été traités par le Brodifacoum à raison de 0,01 mg/kg du poids corporel par jour.

Groupe 3 (G3) : les lapins ont été traités par le Brodifacoum à raison de 0,02 mg/kg du poids corporel par jour

Groupe 4 (G4) : les lapins ont été traités par le Brodifacoum à raison de 0,04 mg/kg du poids corporel par jour.

NB : la durée et les doses du Brodifacoum ont été évoquées de la littérature.

c. Sacrifice et prélèvements des échantillons

➤ Sacrifices des animaux

À la fin de la période du traitement, les lapins sont mis à jeun pendant une nuit. Ils sont sacrifiés le matin par décapitation, le sang a été immédiatement recueilli dans trois tubes différents.

- Un tube EDTA : destiné au dosage des paramètres hématologiques ou formule de numération sanguine (FNS).
- Un tube sec : a subit une centrifugation à 5000 tours/min pendant 15 minutes, ensuite le sérum résultant est récupéré puis placé à -20 °C, il est destiné au dosage des paramètres biochimiques.
- Un tube citraté : destiné à la mesure du taux de prothrombine (TP).

➤ Prélèvement du sperme et de certains organes

Après la dissection, une goutte de sperme est récupérée de l'épididyme dans un tube eppendorf pour effectuer l'analyse du sperme. Le foie, les reins, les testicules, l'épididyme, le cœur, les surrénales et la rate ont été prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés puis pesés. Un échantillon du foie et des testicules ont été fixés dans le formol (10 %) pour réaliser les coupes histologiques. La figure 13 résume le protocole expérimental.

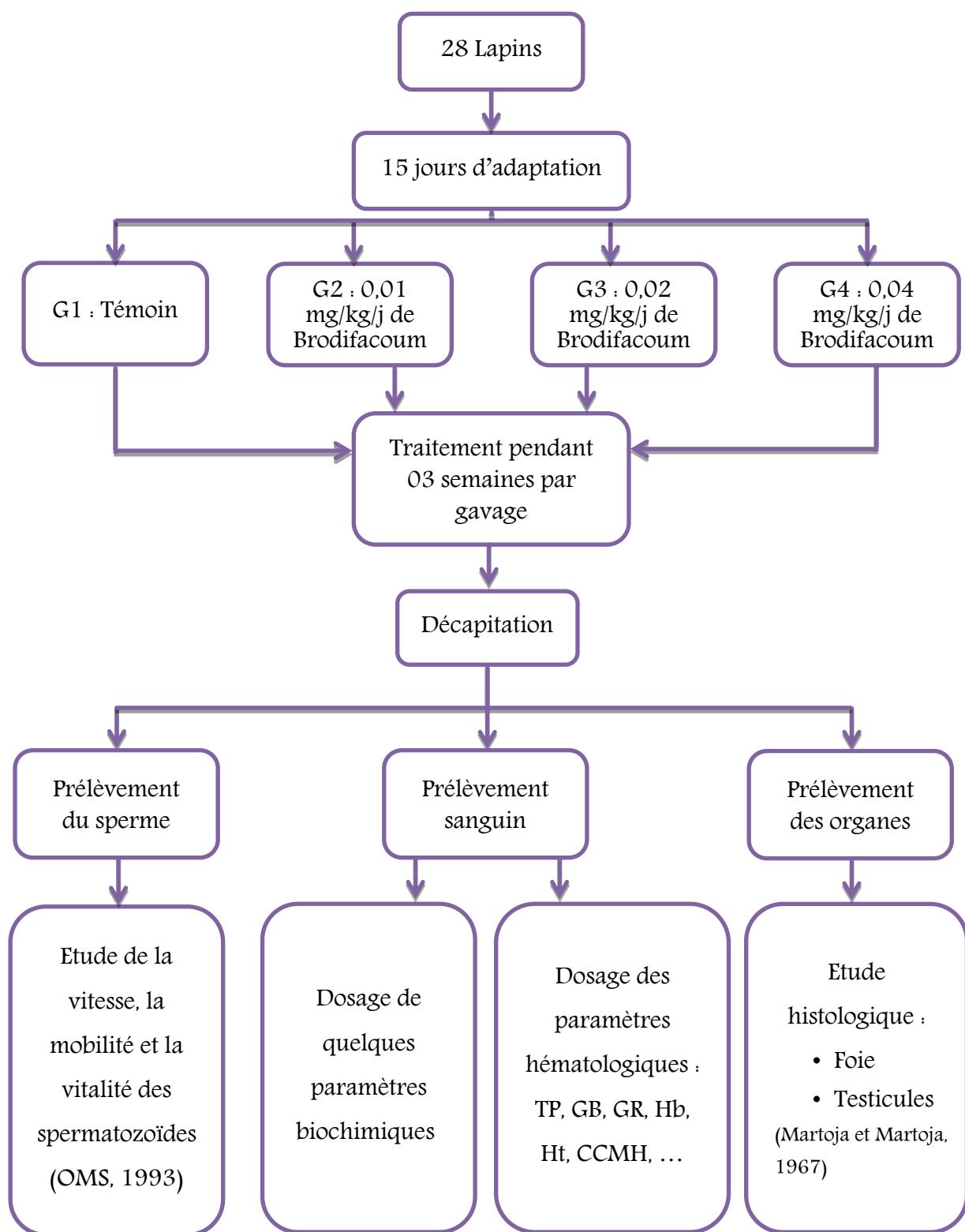


Figure 13 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

II.1.2. Méthodes de dosage

II.1.2.1. Dosage des paramètres hématologiques

➤ Dosage du taux de prothrombine

La détermination du taux de prothrombine (TP) a été réalisée selon la fiche technique (Biolabo). Le Temps de Quick (TQ) permet une exploration de la voie extrinsèque de la coagulation. Le TQ converti en "taux de prothrombine" (TP) permet d'évaluer l'activité des facteurs du complexe prothrombinique en référence à un plasma normal à 100 %.

❖ **Principe :** Cette technique est basée sur les travaux de Neofotistos *et al.* (1998). On détermine le temps de coagulation à 37 °C en présence de thromboplastine tissulaire et de calcium. Le TQ ainsi mesuré pourra être converti en taux de prothrombine (TP).

❖ Réactifs

Réactif 1 :	Thromboplastine	Thromboplastine lyophilisée (tissu cérébral de lapin)
Réactif 2 :	Tampon de reconstitution	Tampon HEPES, Conservateur

Ajouter sans délai au contenu du R₁ la quantité de tampon de reconstitution (R₂) indiquée sur l'étiquette. Mélanger doucement jusqu'à dissolution complète.

❖ Mode opératoire

Déterminer les TQ des plasmas de référence, contrôles et patients en tubes à hémolyse au bain-marie à 37 °C. Préincuber la thromboplastine au moins 15 minutes à 37 °C. Homogénéiser le réactif avant pipetage.

Plasma	0,1 mL
Incuber 2 minutes à 37 °C	
Thromboplastine (préincubée à 37 °C)	0,2 mL
Déclencher le chronomètre simultanément et noter le temps de coagulation.	

Agiter et rechercher le moment de la coagulation en remuant le tube de façon à l'amener presque à l'horizontale, sous un bon éclairage.

❖ Calcul de la concentration

Le calcul du TP a été effectué en utilisant la droite de Thivolle. Le report sur la droite de Thivolle des temps de coagulation trouvés pour les patients permet de déduire le TP (%) des plasmas étudiés (inverse de la valeur lue sur l'axe des abscisses multiplié par 100).

➤ Dosage de la formule de numération sanguine (FNS)

La mesure de la formule de numération sanguine a été effectuée en utilisant un automate d'hématologie (Marque : ERMA INC). Le tube à EDTA contenant le sang est placé dans l'automate et la mesure de la FNS commence. Au bout de 2 minutes les résultats s'affichent sur l'écran et on les imprime. Les paramètres hématologiques mesurés sont : globule rouge (GR), globule blanc (GB), hémoglobine (Hb), hématocrite (HT), plaquettes (PLT), lymphocytes (LY), monocytes (MO), granulocytes (Gr), volume globulaire moyen des hématies (VGM), teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

II.1.2.2. Dosage des paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques mesurés sont : le glucose, l'urée, la créatinine, l'acide urique, le cholestérol, les triglycérides, le calcium et le phosphore.

II.1.2.2.1. Dosage du glucose

La détermination de la glycémie a été réalisée par la méthode enzymatique à la glucose oxydase selon la fiche technique du Kit Spinreact (Espagne).

❖ **Principe :** Le glucose est transformé par la glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine) (Trinder, 1969 ; Kaplan, 1984a) selon les réactions suivantes :



❖ **Réactifs**

Réactif 1 :	Tris pH 7,4	92 mM/L
Tampon	Phénol	0,3 mM/L
Réactif 2 :	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/L
Enzymes	Peroxydase (POD)	1000 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	2,6 mM/L
Glucose calibrant	Glucose aqueux (standard)	100 mg/dL

Dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (μ L)	-	1,0	-
Echantillon (μ L)	-	-	1,0

Mélanger, incuber pendant 10 min à 37 °C ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

❖ Calcul de la concentration

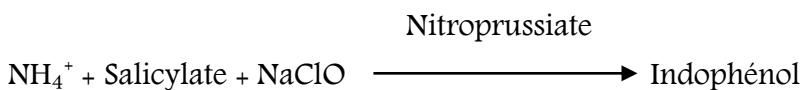
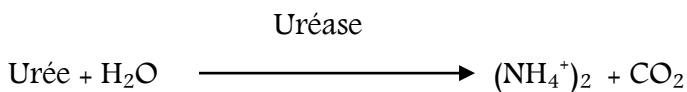
La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

$$\text{Glucose (mg/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (100 mg/dL)}$$

II.1.2.2. Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinreact (Espagne).

❖ **Principe :** l'uréase hydrolyse l'urée en ammonium (NH_4^+) et dioxyde de carbone (CO_2). Les ions ammonium formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite en présence du nitroprussiate, pour former un indophénol vert selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon (Kaplan, 1984b).

❖ Réactifs

Réactif 1 :	Phosphate pH 6,7	50 mM/L
Tampon	EDTA	2 mM/L
	Salicylate de sodium	400 mM/L
	Nitroprussiate de sodium	10 mM/L
Réactif 2 :	Hypochlorite de sodium (NaClO)	140 mM/L
NaClO	Hydroxyde de sodium	150 mM/L
Réactif 3 :	Uréase	3000 U/L
Enzymes		
Urée calibrateur	Urée aqueuse (standard)	50 mg/dL

Dissoudre un comprimé de R₃ dans un flacon de R₁ et mélanger légèrement.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (μL)	-	10	-
Echantillon (μL)	-	-	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante (15-25 °C).

	Blanc	Etalon	Échantillon
R ₂ (mL)	1,0	1,0	1,0
Mélanger et incuber 10 min à température ambiante (15–25 °C). Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 580 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes à 15–25 °C.			

❖ Calcul de la concentration

La concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

$$\text{Urée (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Échantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 50 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

II.1.2.2.3. Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine a été réalisé par la méthode cinétique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

❖ **Principe :** l'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium comme décrit par Jaffé. La créatinine réagit avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intervalle de temps est choisi pour les mesures de telle sorte qu'il évite des interférences avec d'autres constituants de sérum. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon (Murray, 1984).

❖ Réactifs

Réactif 1 :		
Réactif picrique	Acide picrique	17,5 mM/L
Réactif 2 :		
Réactif alcalin	Hydroxyde de sodium	0,29 mM/L
Créatinine calibrateur	Créatinine aqueuse (standard)	2 mg/dL

Mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2. Le réactif du travail est stable pendant 10 jours à 15-25 °C.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	100	-
Echantillon (µL)	-	-	100

Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (A_1) après 30 secondes et la densité optique (A_2) après 90 secondes.

❖ Calcul de la concentration

La concentration de la créatinine est calculée par la formule suivante :

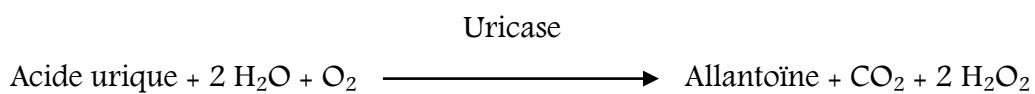
$$\text{Créatinine (mg/dL)} = \frac{(\Delta A) \text{ Echantillon} - (\Delta A) \text{ Blanc}}{(\Delta A) \text{ Etalon} - (\Delta A) \text{ Blanc}} \times 2 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

$$(\Delta A) = A_2 - A_1$$

II.1.2.2.4. Dosage de l'acide urique

Le dosage de l'acide urique a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinreact (Espagne).

❖ **Principe :** l'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne et peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$) qui, sous l'influence de la peroxydase du 4-aminophénazone (4-AP), et du 2-4 dichlorophénol-sulfonate (DCPS), forme un composé rouge de quinonéimine donné par les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon (Schultz, 1984).

❖ Réactifs

Réactif 1 :	Phosphate pH 7,4	50 mM/L
Tampon	2-4 dichlorophénol sulfonate (DCPS)	4 mM/L
Réactif 2 :	Uricase	60 U/L
Enzymes	Peroxydase (POD)	660 U/L
	Ascorbate oxydase	200 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	1 mM/L
Acide urique calibrateur	Acide urique aqueux (standard)	6 mg/dL

Dissoudre le contenu d'une bouteille de R₂ dans un flacon de R₁. Mélanger légèrement. La couleur est stable pendant 30 minutes.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	25	-
Echantillon (µL)	-	-	25

Mélanger et incuber 10 min à 15–25 °C. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 520 nm.

❖ Calcul de la concentration

La concentration de l'acide urique est calculée par la formule suivante :

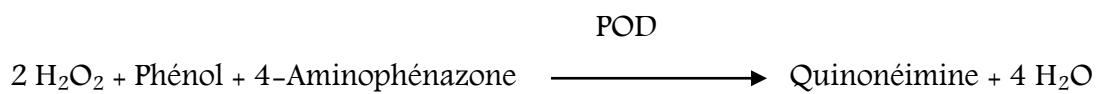
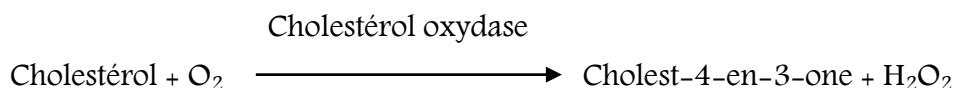
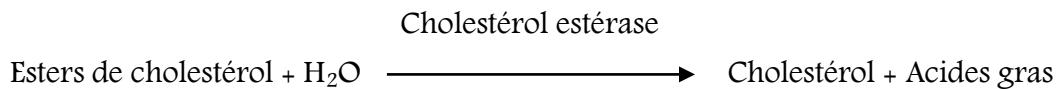
$$\text{Acide urique (mg/dL)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 6 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

II.1.2.2.5. Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinreact (Espagne).

❖ **Principe** : le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. La cholestérol estérase hydrolyse les esters et le H₂O₂ est formé dans la réaction d'oxydation enzymatique du cholestérol sous l'action de la cholestérol

oxydase. Le peroxyde d'hydrogène réagit avec le phénol pour produire le quinonéimine, selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (Naito, 1984).

❖ Réactifs

Réactif 1 :	PIPES pH 6,9	90 mM/L
Tampon	Phénol	26 mM/L
Réactif 2 :	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
Enzymes	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	1250 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,4 mM/L
Cholestérol calibrateur	Cholestérol aqueux (standard)	200 mg/dL

Dissoudre le contenu d'une bouteille de R₂ dans un flacon de R₁ et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 4 mois à 2-8 °C ou 40 jours à 15-25 °C.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Échantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (μ L)	-	10	-
Échantillon (μ L)	-	-	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 60 minutes.

❖ Calcul de la concentration

La concentration du cholestérol est calculée par la formule suivante :

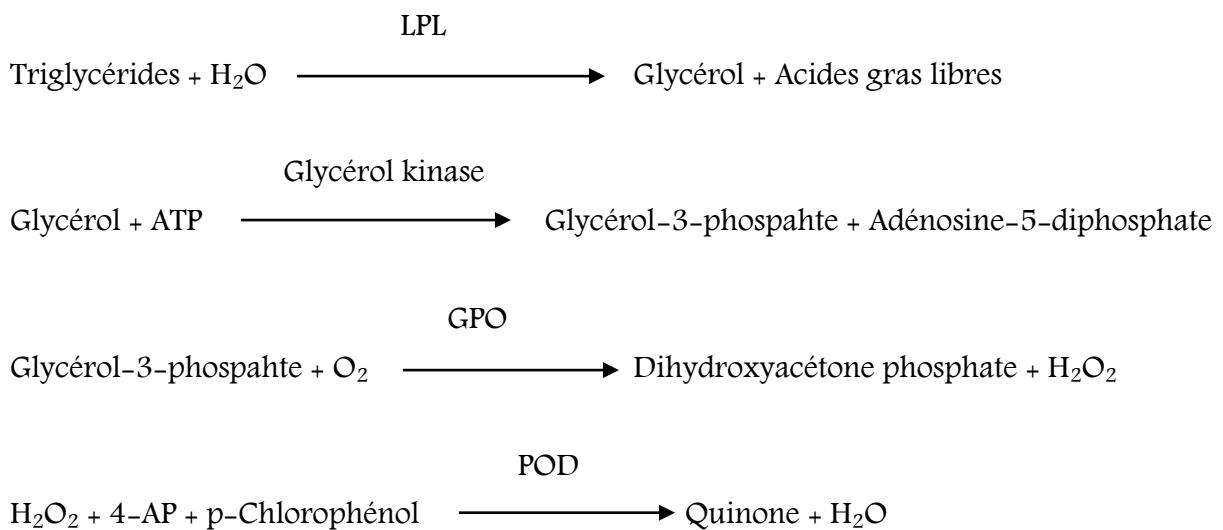
$$\text{Cholestérol (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Échantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 200 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

II.1.2.2.6. Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinreact (Espagne).

❖ **Principe :** les triglycérides incubés avec la lipoprotéinlipase (LPL), libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G_3P) et adénosine-5-diphosphate (ADP) par la glycérol kinase et l'adénosine triphosphate (ATP). Le glycérol-3-phosphate (G_3P) est alors converti par la glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et p-chlorophénol en présence de la

peroxydase (POD) pour donner une coloration rouge. Le protocole comprend donc les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon (Bucolo et David, 1973).

❖ Réactifs

Réactif 1 :	GOOD pH 7,5	50 mM/L
Tampon	p-Chlorophénol	2 mM/L
	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
Réactif 2 :	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/L
Enzymes	Peroxydase (POD)	440 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,1 mM/L
	ATP	0,1 mM/L
Triglycérides calibrateur	Triglycérides aqueux (standard)	200 mg/dL

Dissoudre le contenu d'une bouteille de R₂ dans un flacon de R₁ et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8 °C ou une semaine à 15-25 °C.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Échantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (μ L)	-	10	-
Échantillon (μ L)	-	-	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes.

❖ Calcul de la concentration

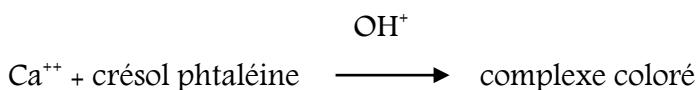
La concentration des triglycérides est calculée par la formule suivante :

$$\text{Triglycérides (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Échantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 200 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

II.1.2.2.7. Dosage du calcium

Le dosage du calcium a été réalisé par la méthode colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinreact (Espagne).

❖ **Principe** : le calcium forme en milieu alcalin un complexe coloré en violet avec le complexant crésol phtaléine.



L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration du calcium dans l'échantillon (Farell, 1984a).

❖ Réactifs

Réactif 1 : Tampon	Tampon alcalin	500 mM/L
	2-amino-2-méthyle	
	1-propanol	
Réactif 2 : Chromogène	Complexant crésol phtaléine	0,62 mM/L
	hydroxy 8 quinoléine	69 mM/L
Réactif 3 : Etalon	Etalon du calcium	10 mg/dL

Mélanger 1 volume de réactif R₁ avec 1 volume de réactif R₂, en quantité suffisante pour le nombre de dosage à faire.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	20	-
Echantillon (µL)	-	-	20

Mélanger et incuber 5 min à température ambiante (15-25 °C). Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 570 nm. La couleur est stable pendant 40 minutes à 15-25 °C.

❖ Calcul de la concentration

La concentration du calcium est calculée par la formule suivante :

$$\text{Calcium (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 10 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

II.1.2.2.8. Dosage du phosphore

Le dosage du phosphore a été réalisé par la méthode colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinreact (Espagne).

❖ **Principe** : le phosphore réagit dans le milieu acide avec le molybdate d'ammonium pour former un complexe de phosphomolybdate d'une couleur jaune. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration du phosphore dans l'échantillon (Farell, 1984b).

❖ Réactifs

Réactif :	Molybdate d'ammonium	0,40 mM
	Acide sulfurique (SO_4H_2)	210 mM
	Détergents	
Phosphore calibrateur	Phosphore aqueux (standard)	5 mg/dL

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (μL)	-	10	-
Echantillon (μL)	-	-	10

Mélanger et incuber 5 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 340 nm.

❖ Calcul de la concentration

La concentration du phosphore est calculée par la formule suivante :

$$\text{Phosphore (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 5 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

II.1.2.3. Etude de la biologie des spermatozoïdes

L'étude de la biologie des spermatozoïdes selon la méthode de l'OMS (1993). Après dissection, le sperme est prélevé à partir de la tête de l'épididyme pour étudier : la concentration, la vitesse, la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes. 1 μL de sperme est ajouté à 49 μL de l'eau physiologique NaCl 0,9 % préparé au préalable.

II.1.2.3.1. La vitesse des spermatozoïdes

Une goutte du sperme diluée est déposée sur une lame de Nageotte à l'aide d'une micropipette puis recouverte d'une lamelle, nous calculons le temps écoulé pour le déplacement des spermatozoïdes. La préparation est examinée à un grossissement final 400 \times . L'examen peut cependant être fait dans des conditions de température ambiante du laboratoire. Chaque lame de Nageotte contient des lignes horizontales séparées d'une distance de 0,5 mm. Le principe est de calculer le temps de déplacement d'un spermatozoïde entre deux lignes à l'aide d'un chronomètre.

La vitesse des spermatozoïdes est calculée par l'application de la relation suivante :

$$V = d/t$$

V : vitesse de spermatozoïdes ($\mu\text{m/sec}$)

d : la distance entre 2 lignes (0,5 mm)

t : le temps de déplacement (sec)

NB : La vitesse de 10 spermatozoïdes est calculée.

II.1.2.3.2. Concentration des spermatozoïdes

La concentration des spermatozoïdes est mesurée en utilisant une cellule de Malassez. Nous procédons au comptage des spermatozoïdes dans cinq cellules au grossissement 400×.

La concentration des spermatozoïdes est calculée par l'équation suivante :

Concentration (spz. 10^6 /mL) = $(D \times V \times n) / N$ (figure 14).

D : coefficient de dilution (50)

V : volume de la cellule de Malassez

n : le nombre de spermatozoïdes comptés dans 05 cellules

N : le nombre de petites cellules (100)

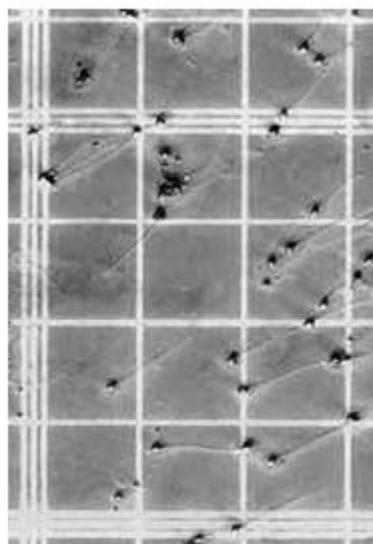


Figure 14 : Comptage de la concentration des spermatozoïdes dans la cellule de Malassez.

II.1.2.3.3. La mobilité des spermatozoïdes

Une goutte de sperme est déposée sur une lame, puis recouverte d'une lamelle. L'observation en microscope se fait au grossissement $400\times$. Le champ d'observation est divisé en 03, le pourcentage des spermatozoïdes mobiles est calculé pour 100 spermatozoïdes.

II.1.2.3.4. La vitalité des spermatozoïdes

➤ **Coloration vitale** : Cette étude utilise une technique de coloration basée sur le principe que les cellules mortes ayant des membranes plasmiques lésées laissent pénétrer certains colorants comme l'éosine à 1 %. Mélanger une goutte du sperme diluée avec une goutte de solution d'éosine à 1 % sur une lame puis recouvrir la préparation avec une lamelle. Après une à deux minutes, l'observation est faite en microscope optique au grossissement toujours $400\times$. Nous comptons 100 spermatozoïdes : vivants (non colorés) et morts (colorés). Le pourcentage des spermatozoïdes vivants est ainsi calculé (figure 15).

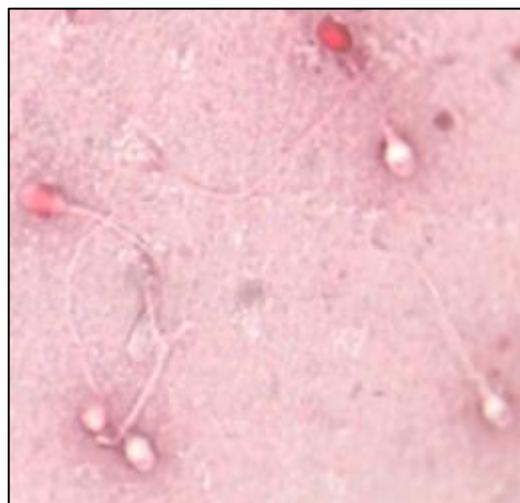


Figure 15 : Coloration vitale (Eosine à 1%) des spermatozoïdes.

➤ **Test hypo-osmotique** : ce test de vitalité est réalisé en utilisant une solution de citrate de sodium préparée comme suit : dissoudre 0,367g de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 0,675g de fructose dans < 50 ml d'eau distillée (conserver à -20 °C). Il consiste à calculer le pourcentage des spermatozoïdes ayant une malformation du flagelle. Au moment de l'usage, la solution est décongelée et bien mélangée. Pendant 5 minutes environ, réchauffé à 37 °C, 1 mL de la solution placé dans un tube Eppendorf fermé. On ajoute 0,1 mL de sperme liquéfié et on mélange doucement à l'aide d'une pipette. Laisser incuber à 37 °C pendant 30 minutes puis observer les spermatozoïdes sous microscope à un grossissement (400×). Les spermatozoïdes gonflés sont ceux qui présentent des modifications du flagelle. On calcule le pourcentage des spermatozoïdes présentant des modifications du flagelle sur un total de 100 spermatozoïdes comptés (figure 16) (Jeyendran *et al.*, 1984 ; OMS, 1993).

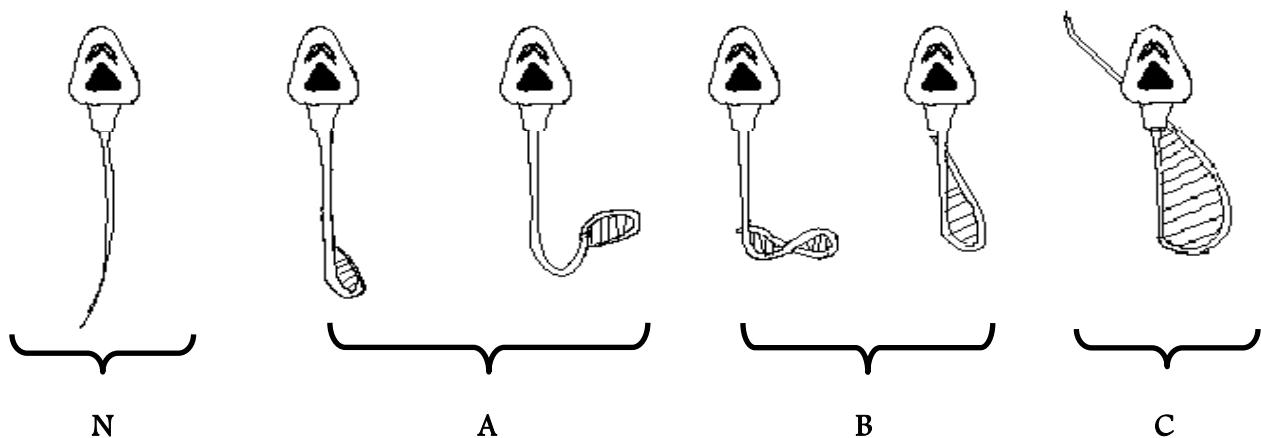


Figure 16 : Présentation schématique des modifications morphologiques des spermatozoïdes exposés à un stress hypo-osmotique.

(N) : spermatozoïde avec flagelle normal, (A) : modification faible du flagelle, (B) : modification importante du flagelle, (C) : modification très importante du flagelle.

II.1.2.4. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital d'Ibn Rochd d'Annaba, service d'anatomie pathologique, suivant la technique décrite par (Martoja et Martoja, 1967). La technique comporte les étapes suivantes :

a. Fixation des échantillons

Elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après la décapitation des lapins et prélèvement des organes. Des fragments de foie (surface 1 à 2 cm² et épaisseur 2 mm) et le testicule ont été alors mis dans le formol qui constitue le fixateur classique le plus utilisé. Il permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer. Après 48 heures de fixation les pièces d'organes sont retirées du formol puis rincées à l'eau distillée. Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent.

b. Déshydratation des échantillons

Comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine

transparence. Ensuite, dans l'étuve, le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Cette étape est réalisée par un appareil appelé « le Circulateur ».

c. Inclusion des échantillons

Les pièces sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide. Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils «dits à inclusion» refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 μm en moyenne) est possible grâce à des appareils spéciaux appelés « Microtomes ». Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, déplissées et fixés sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

d. Confection des coupes histologiques

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 μm . Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis déplissés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

e. Coloration

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) ; qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 mL d'alcool éthylique à 70 % + 50 mL d'acide HCl), eau ammoniacale (100 mL d'eau distillée + 2 mL Ammoniaque)

et solution d'éosine (100 mL Eosine solution aqueuse à 3 %, 125 mL alcool éthylique à 95 %, 375 mL d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suive les étapes suivantes :

- ❖ Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- ❖ Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux).
- ❖ Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- ❖ Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- ❖ Immerger dans un bain d'éosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo.

II.1.2.5. Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne plus ou moins l'écart type (Moyenne \pm SD). L'analyse des données a été effectuée par application du test *t* de Student, qui est basé sur la comparaison des moyennes deux à deux : entre le groupe témoin et chaque des groupes traités, en utilisant le logiciel MINITAB (Version 16). Les différences sont considérées comme :

- Significatives : lorsque ($P \leq 0,05$).
- Hautement significatives : lorsque ($P \leq 0,01$).
- Très hautement significatives : lorsque ($P \leq 0,001$).

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

RÉSULTATS

ETAT

II.2. Résultats

II.2.1. Influence du traitement sur le poids corporel

Au cours de la période de traitement des lapins par le Brodifacoum, il a été enregistré un taux de mortalité de 28,5 % au cinquième jour de la deuxième semaine chez les lapins traités à la forte dose (0,04 mg/kg/j). La figure 17 représente les résultats obtenus de la variation du poids corporel des lapins témoins et traités. Les résultats obtenus montrent une diminution du poids corporel chez les groupes traités par rapport au groupe témoin.

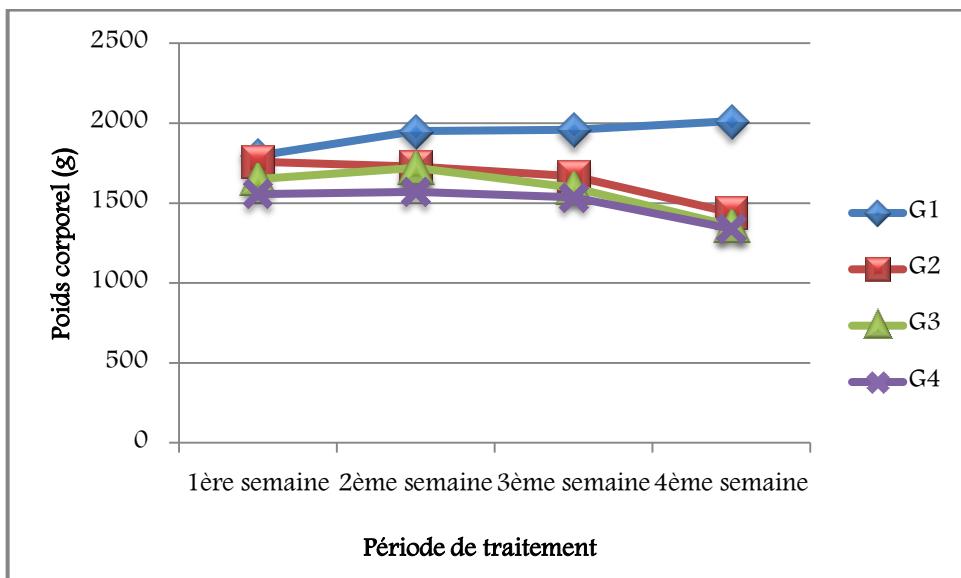


Figure 17 : Variations du poids corporel chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

II.2.2. Influence du traitement sur le rapport organo-corporel

Nous avons constaté une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) des indices hépatosomatiques chez tous les groupes traités comparés au groupe témoin. Une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) a été notée des indices spléno-somatiques chez le

deuxième groupe (G2) et très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les groupes (G3 et G4) toujours comparés au témoin. Le traitement par le Brodifacoum a provoqué une augmentation significative ($P \leq 0,05$) des rapports cardio-somatiques chez les lapins traité par 0,01 mg/kg/j et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les lapins traité par 0,02 et 0,04 mg/kg/j. Plus, une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les groupes (G3 et G4) des indices gonado-somatiques a été observée. Une diminution significative ($P \leq 0,05$) du poids relatif de l'épididyme gauche a été enregistrée chez le groupe (G2) et avec une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les groupes (G3 et G4) par rapport au groupe témoin. Aussi, nos résultats montrent une augmentation non significative des indices réno-somatiques chez tous les groupes traités par rapport au groupe témoin. Concernant la glande surrénale nous constatons une augmentation significative ($P \leq 0,05$) chez les groupes (G2 et G3) et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez le groupe (G4) par rapport au groupe témoin (tableau 14 ; figure 18-28).

Tableau 14 : Variations des rapports organo-corporels (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

Rapport (%)	Groupes			
	G1	G2	G3	G4
Foie	1,869 \pm 0,233	2,340 \pm 0,169**	2,731 \pm 0,121**	3,190 \pm 0,244**
Rate	0,0458 \pm 0,0025	0,0628 \pm 0,0070**	0,1074 \pm 0,018***	0,1517 \pm 0,0145***
Cœur	0,3389 \pm 0,0150	0,3752 \pm 0,0180*	0,4007 \pm 0,0183**	0,4128 \pm 0,00274**
Testicule droit	0,1006 \pm 0,0150	0,0864 \pm 0,0113	0,0549 \pm 0,0109**	0,0519 \pm 0,0092**
Testicule gauche	0,0920 \pm 0,0127	0,0842 \pm 0,0110	0,0508 \pm 0,0124**	0,0504 \pm 0,0099**
Epididyme droit	0,0237 \pm 0,0021	0,0207 \pm 0,002	0,0181 \pm 0,001	0,0170 \pm 0,001
Epididyme gauche	0,0214 \pm 0,0019	0,0186 \pm 0,0010*	0,0152 \pm 0,0007**	0,0148 \pm 0,0007**
Rein droit	0,3451 \pm 0,0361	0,3738 \pm 0,00085	0,3875 \pm 0,0361	0,4015 \pm 0,0483
Rein gauche	0,3587 \pm 0,0508	0,3800 \pm 0,0443	0,4004 \pm 0,0449	0,4332 \pm 0,0450
Surrénale droite	0,0129 \pm 0,0002	0,0155 \pm 0,0012*	0,0157 \pm 0,0009**	0,0167 \pm 0,0009**
Surrénale gauche	0,0118 \pm 0,0015	0,0144 \pm 0,0008*	0,0147 \pm 0,0006*	0,0152 \pm 0,0005**

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence hautement significative.

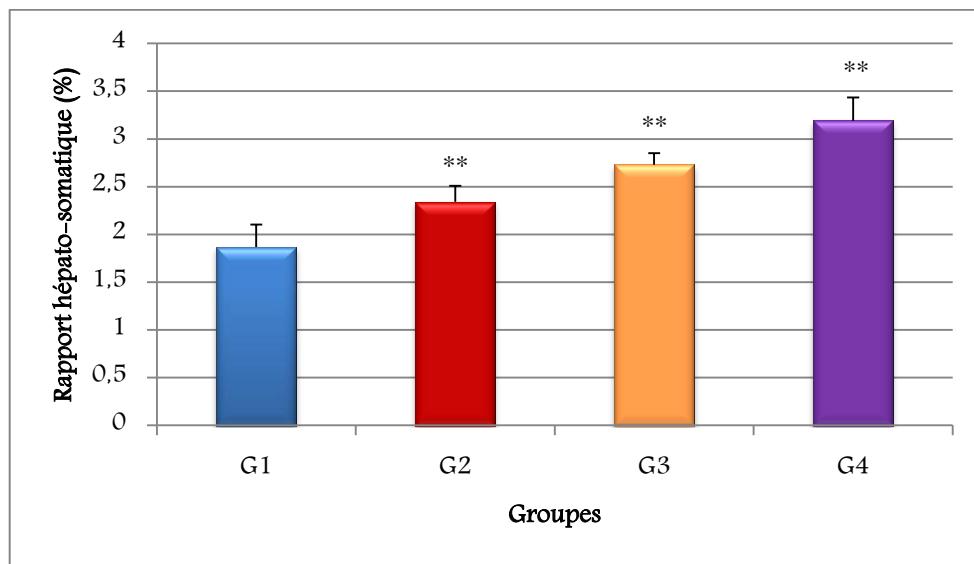


Figure 18 : Variations du rapport hépato-somatique (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

** ($P \leq 0.001$) : Différence hautement significative.

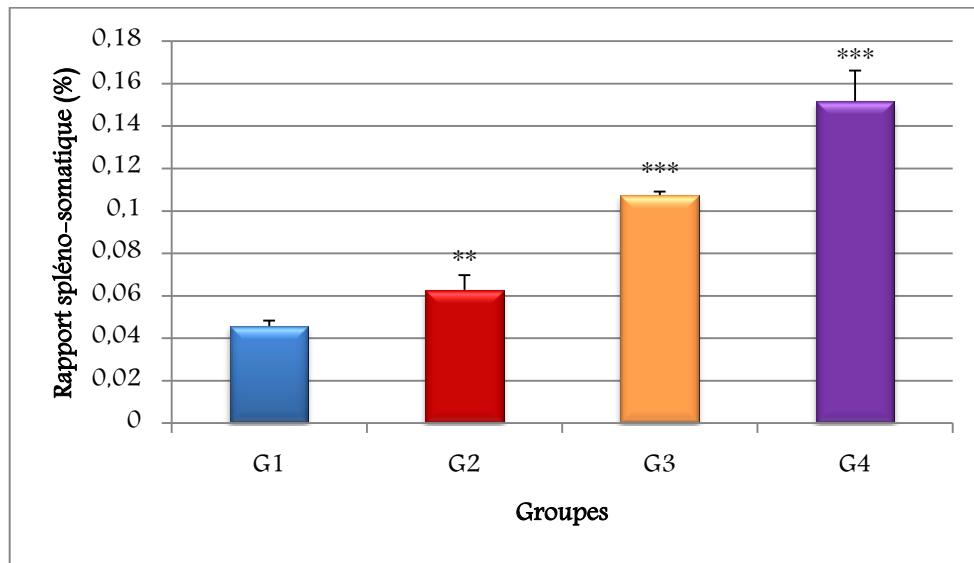


Figure 19 : Variations du rapport spléno-somatique (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

** ($P \leq 0.01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0.01$) : Différence très hautement significative.

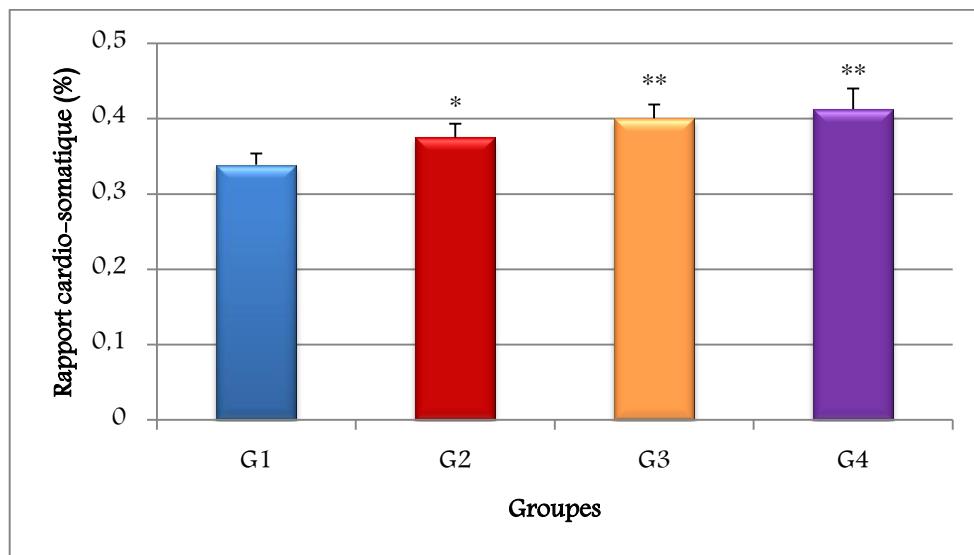


Figure 20 : Variations du rapport cardio-somatique (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0.05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0.01$) : Différence hautement significative.

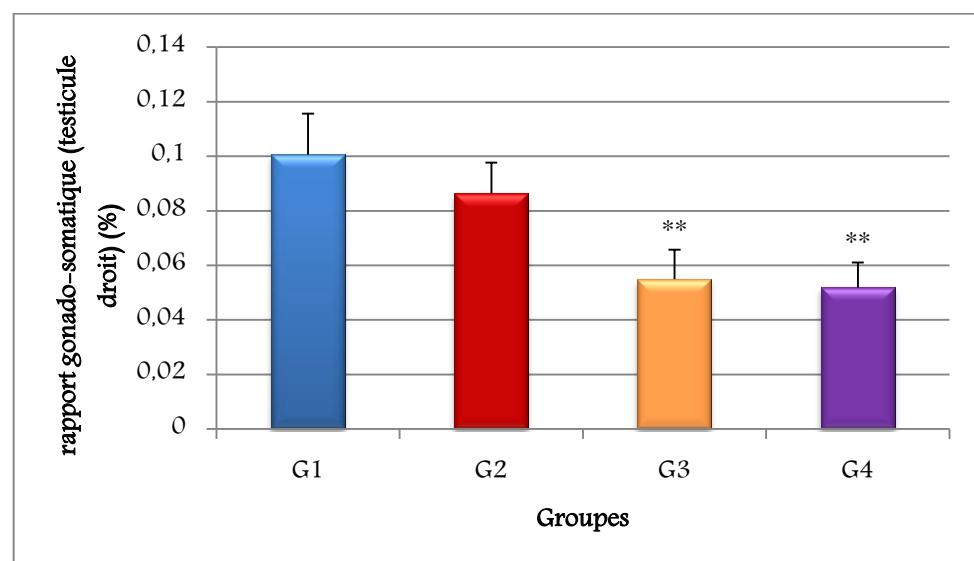


Figure 21 : Variations du rapport gonado-somatique (testicule droit) (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

** ($P \leq 0.01$) : Différence hautement significative.

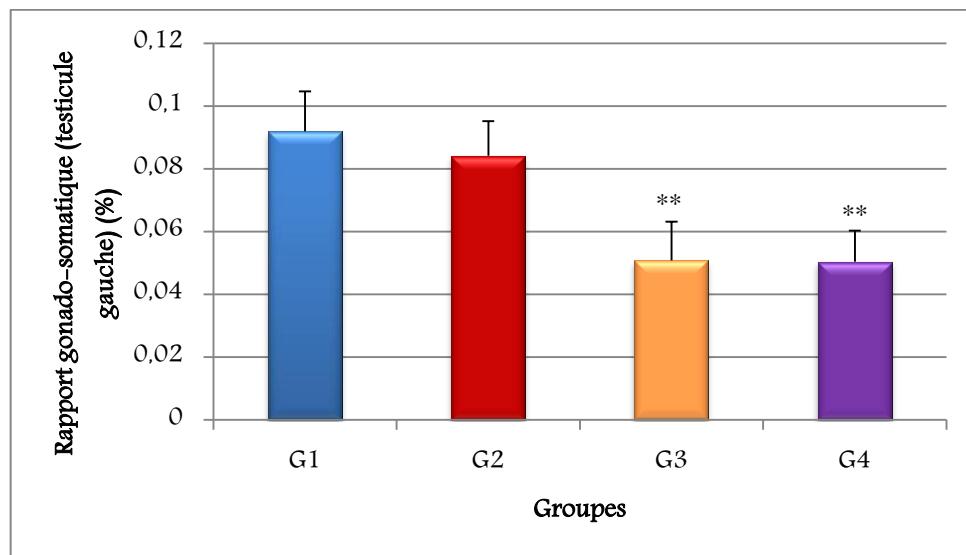


Figure 22 : Variations du rapport gonado-somatique (testicule gauche) (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

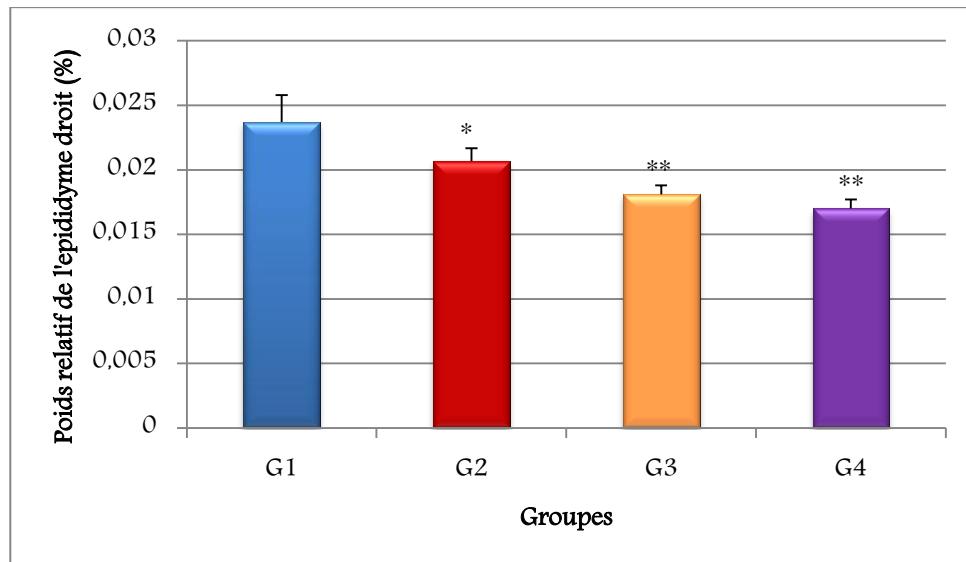


Figure 23 : Variations du poids relatif de l'épididyme droit (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

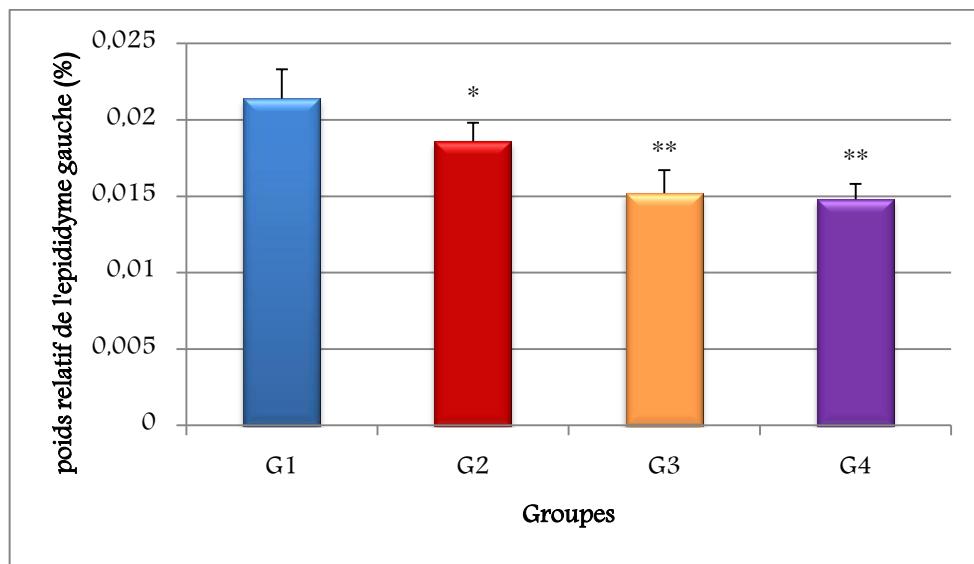


Figure 24 : Variations du poids relatif l'épididyme gauche (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

*($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

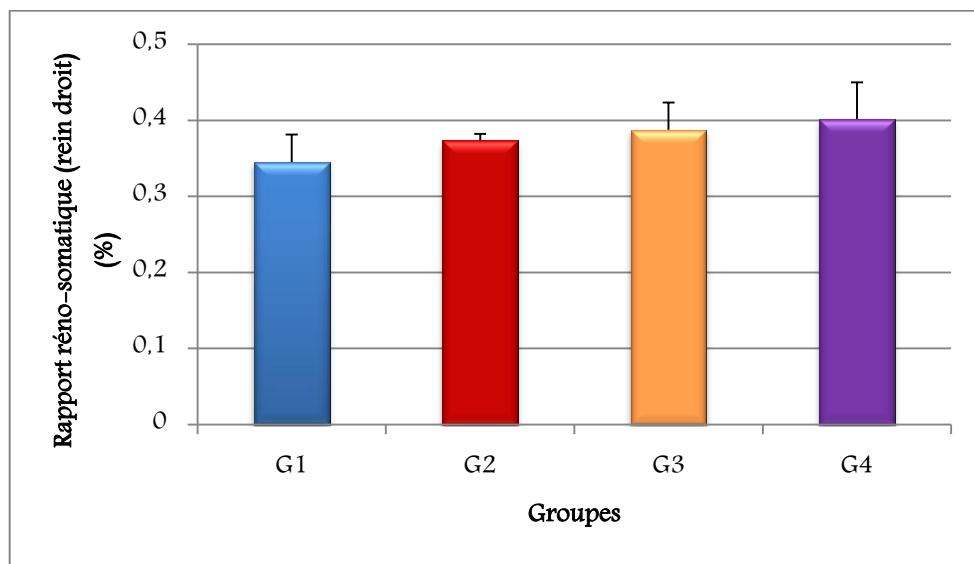


Figure 25 : Variations du rapport réno-somatique (rein droit) (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

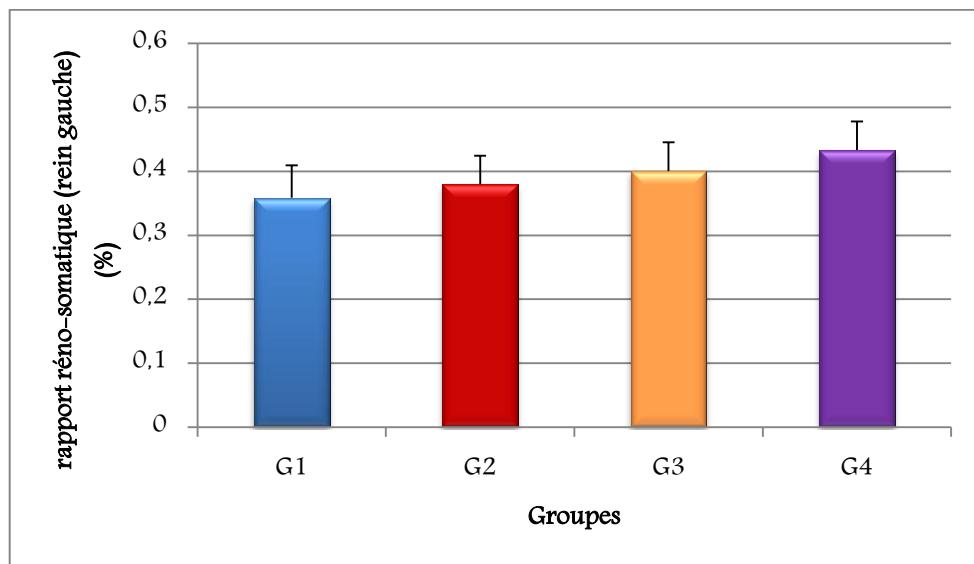


Figure 26 : Variations du rapport réno-somatique (rein gauche) (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

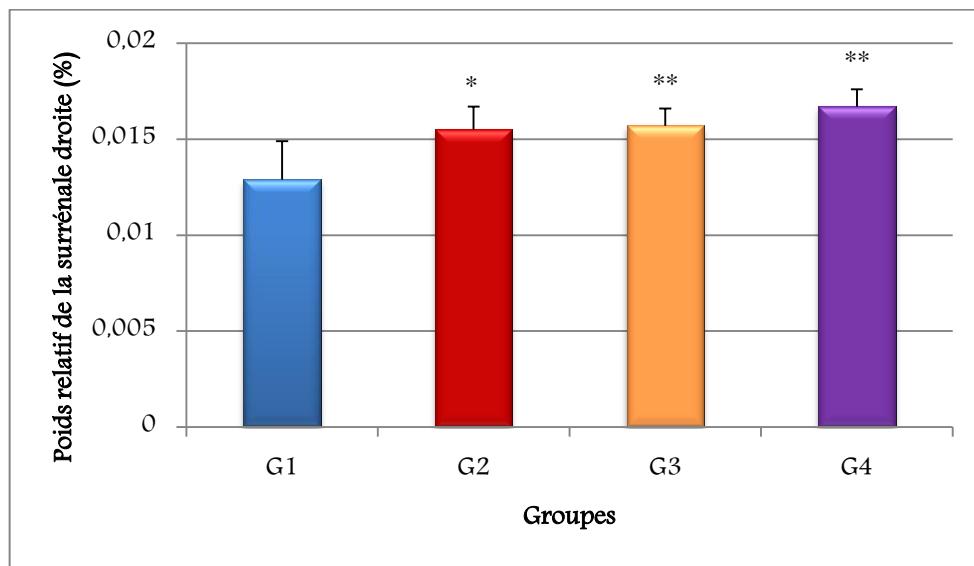


Figure 27 : Variations du poids relatif de la surrénale droite (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

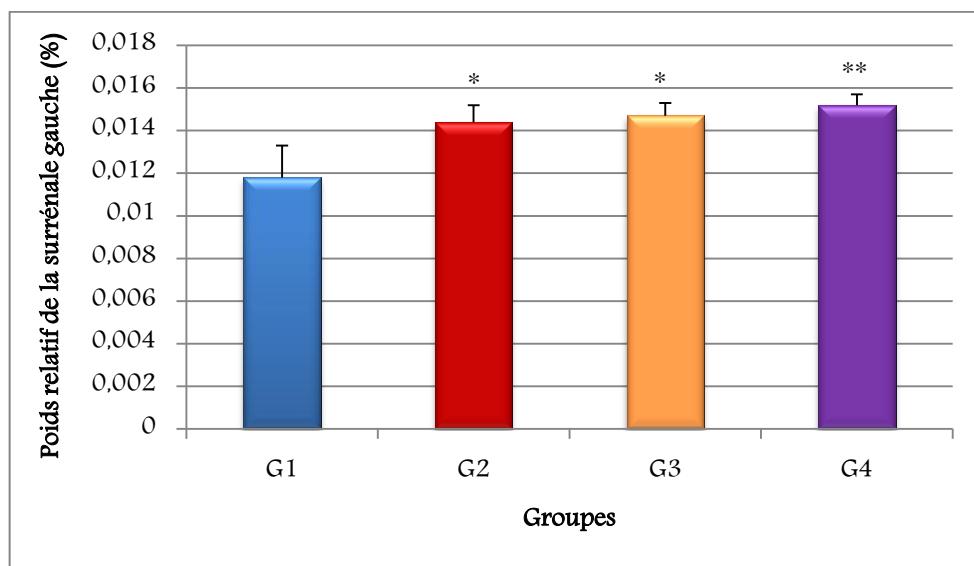


Figure 28 : Variations du poids relatif de la surrénale gauche (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

II.2.3. Influences du traitement sur les paramètres hématologiques

- **Taux de prothrombine**

Le tableau 15 et la figure 29 illustrent les variations du taux de la prothrombine. Une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) du TP chez les lapins traités par 0,01 mg/kg/j de Brodifacoum a été observée. Une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) a été constatée chez les lapins traités aux 0,02 et 0,04 mg/kg/j par rapport aux lapins témoins.

Tableau 15 : Variations du TP (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

	G1	G2	G3	G4
TP (%)	83,60 \pm 5,18	68,4 \pm 5,32**	52,60 \pm 5,41***	34,40 \pm 3,78***

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

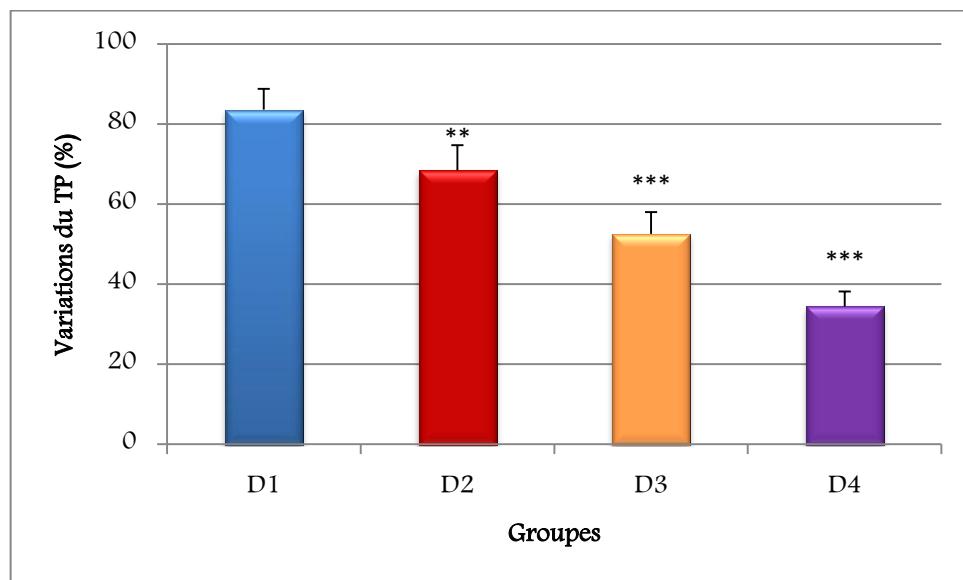


Figure 29 : Variations du TP (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4)

après 03 semaines de traitement.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

■ La formule numérique sanguine

Le tableau 16 et les figures (30-40) illustrent les résultats de la formule numérique sanguine des lapins témoins et traités. Après 03 semaines de traitement par le Brodifacoum, nous

avons remarqué une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) des globules blancs chez le troisième groupe (G4), et une augmentation significative ($P \leq 0,05$) chez les deux autres groupes (G2 et G3) comparés au groupe témoin. Une diminution significative des globules rouges ($P \leq 0,05$) chez les lapins du groupe (G2) et (G3) et une diminution hautement significative chez les lapins du groupe (G4) par rapport aux témoins ont été enregistrées. Une diminution significative ($P \leq 0,05$), hautement significative ($P \leq 0,01$), très hautement significative ($P \leq 0,001$) des plaquettes a été observée chez les groupes (G2, G3) et (G4), respectivement par rapport au groupe témoin. Chez les lapins des groupes (G2, G3) on a noté une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) des hématocrites, aussi, on a enregistré une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez le groupe traité par la plus forte dose comparant aux lapins non traités. De plus, une diminution significative ($P \leq 0,05$) de l'hémoglobine est observée chez le groupe (G2), et une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) est observée chez le groupe (G3, G4) par rapport au groupe témoin. Nous avons signalé une augmentation significative ($P \leq 0,05$) des lymphocytes et très hautement significative ($P \leq 0,001$) des granulocytes chez le groupe (G4). Quant aux monocytes, nous avons constaté une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) chez le groupe (G3) et très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez le groupe (G4), tout en comparant au groupe témoin. Par ailleurs, nous avons enregistré d'une part une diminution significative des taux de la VGM au niveau des doses 0,02 et 0,04 mg/kg/j et d'autre part une diminution significative ($P \leq 0,05$) et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les groupes (G3) et (G4), respectivement, comparant au témoin. Les résultats obtenus du taux de la CCMH exposent une diminution significative ($P \leq 0,05$) chez les groupes (G2) et (G3), et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez le groupe (G4) par rapport au témoin.

Tableau 16 : Variations des paramètres hématologiques chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

Paramètres	Groupes			
	G1 Control	G2 0.01 mg/kg/j	G3 0.02 mg/kg/j	G4 0.04 mg/kg/j
GB ($10^3/\mu\text{L}$)	5,78 \pm 0,823	7,2 \pm 0,686*	7,70 \pm 1,01*	10,72 \pm 1,06***
GR ($10^6/\mu\text{L}$)	5,636 \pm 0,565	4,568 \pm 0,729*	4,372 \pm 0,480*	3,536 \pm 0,653**
Hb (g/dL)	8,52 \pm 0,909	7,26 \pm 0,733*	5,72 \pm 0,650**	5,12 \pm 0,449**
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	382,6 \pm 57,6	265,2 \pm 13,9*	187,4 \pm 22,8**	97,4 \pm 14,4***
Ht (%)	37,38 \pm 2,44	28,72 \pm 1,51**	28,62 \pm 0,981**	25,46 \pm 1,90***
LY ($10^3/\mu\text{L}$)	2,27 \pm 0,45	2,85 \pm 0,20	3,14 \pm 0,22	4,84 \pm 0,57*
MO ($10^3/\mu\text{L}$)	0,80 \pm 0,07	1,27 \pm 0,19	1,70 \pm 0,08**	2,54 \pm 0,21***
Gr ($10^3/\mu\text{L}$)	2,17 \pm 0,14	2,32 \pm 0,17	2,82 \pm 0,38	3,92 \pm 0,07***
VGM (fl)	73,5 \pm 2,90	64,23 \pm 4,60	61,46 \pm 1,30*	58,61 \pm 1,10*
TCMH (fl)	15,65 \pm 0,45	14,45 \pm 0,16	13,78 \pm 0,31*	13,42 \pm 0,30**
CCMH (g/dL)	25,20 \pm 0,41	23,05 \pm 0,63*	22,00 \pm 0,58*	21,70 \pm 0,93**

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence hautement significative.

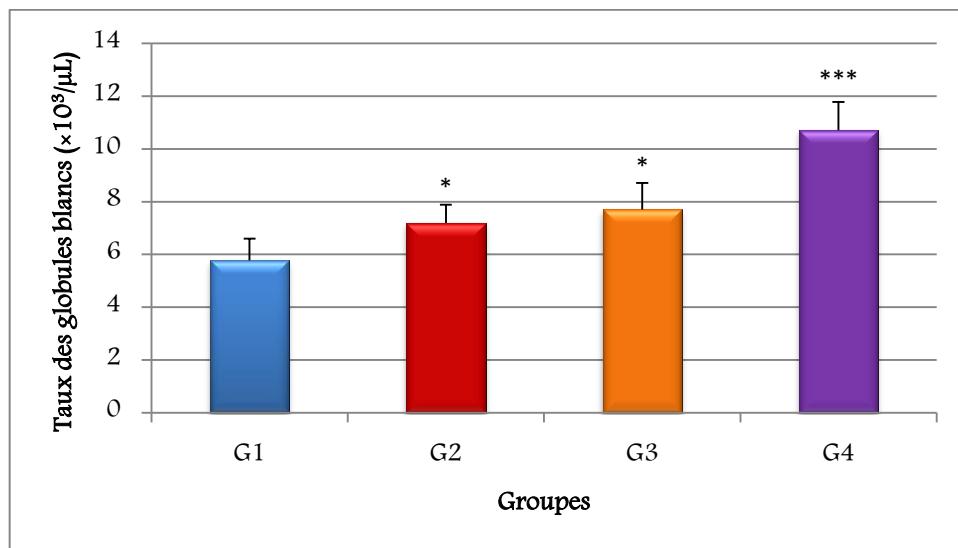


Figure 30 : Variation du nombre des globules blancs ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

$*(P \leq 0,05)$: Différence significative.

$*** (P \leq 0,001)$: Différence très hautement significative.

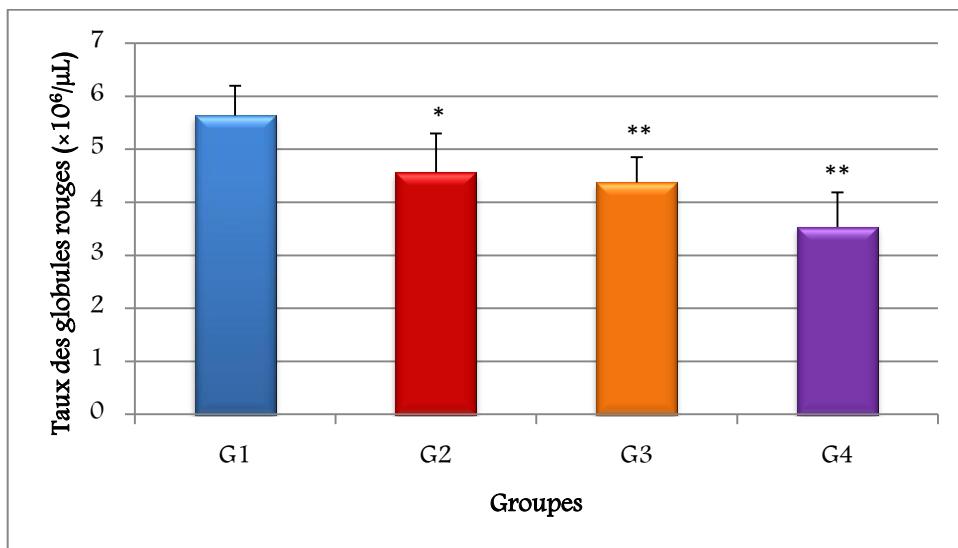


Figure 31 : Variation du nombre des globules rouges ($10^6/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

$*(P \leq 0,05)$: Différence significative.

$** (P \leq 0,01)$: Différence hautement significative.

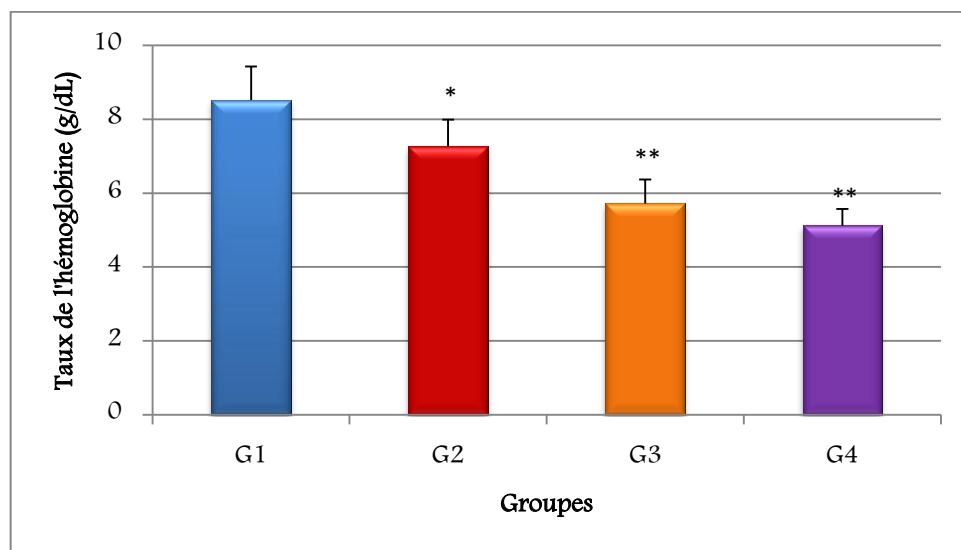


Figure 32 : Variation du taux de l'hémoglobine (g/dL) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

*($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

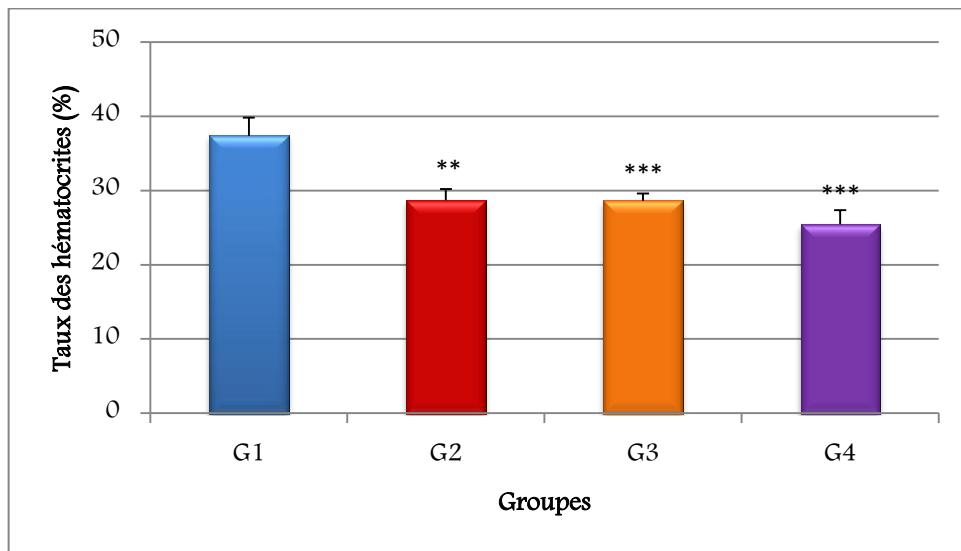


Figure 33 : Variation du taux des hématocrites (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

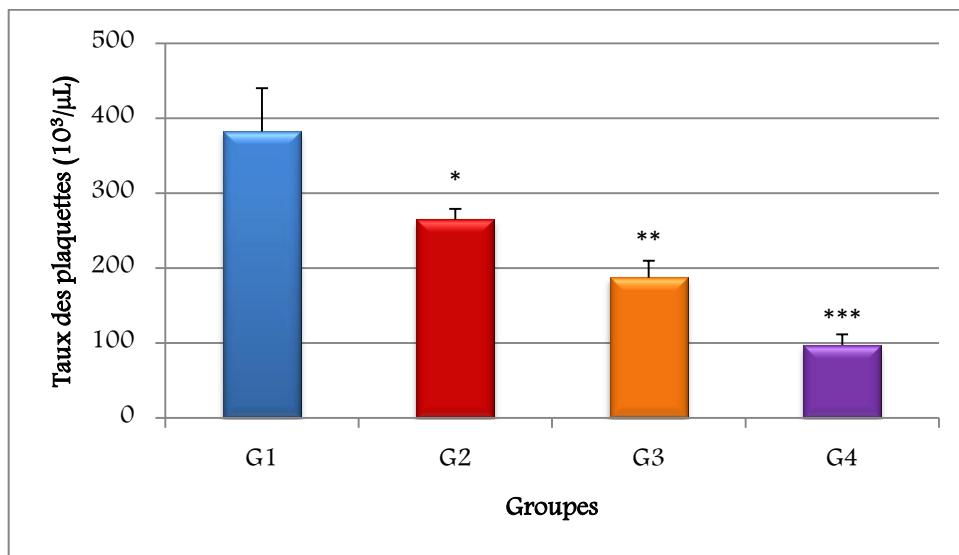


Figure 34 : Variation du taux des plaquettes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0.05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0.01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0.001$) : Différence très hautement significative.

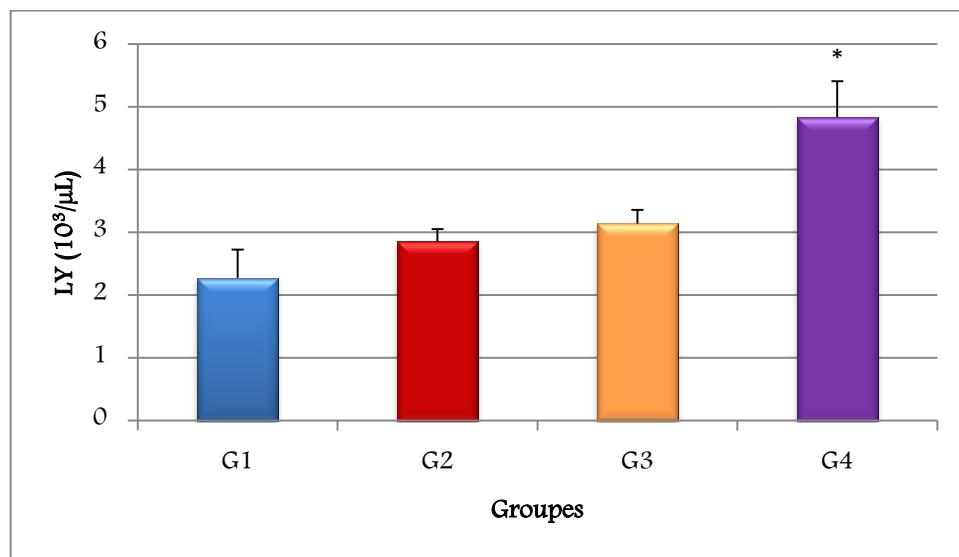


Figure 35 : Variation du nombre des lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0.05$) : Différence significative.

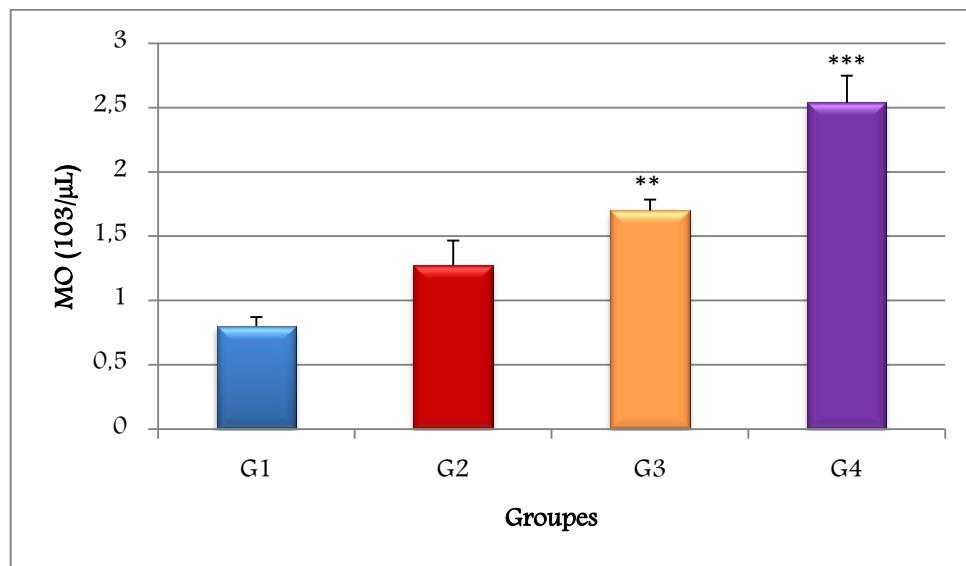


Figure 36 : Variation du nombre des monocytes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

** ($P \leq 0.01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0.001$) : Différence très hautement significative.

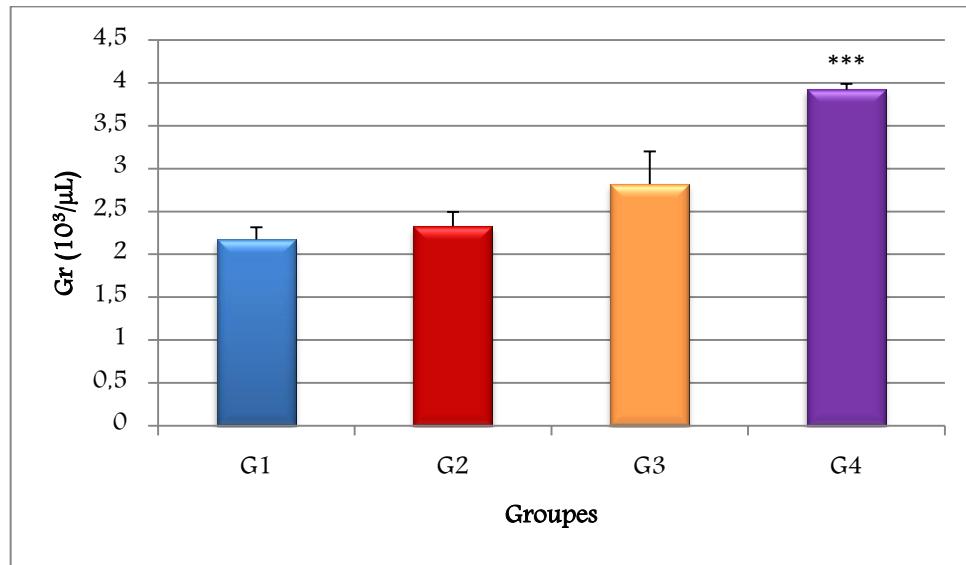


Figure 37 : Variation du nombre des granulocytes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

*** ($P \leq 0.001$) : Différence très hautement significative.

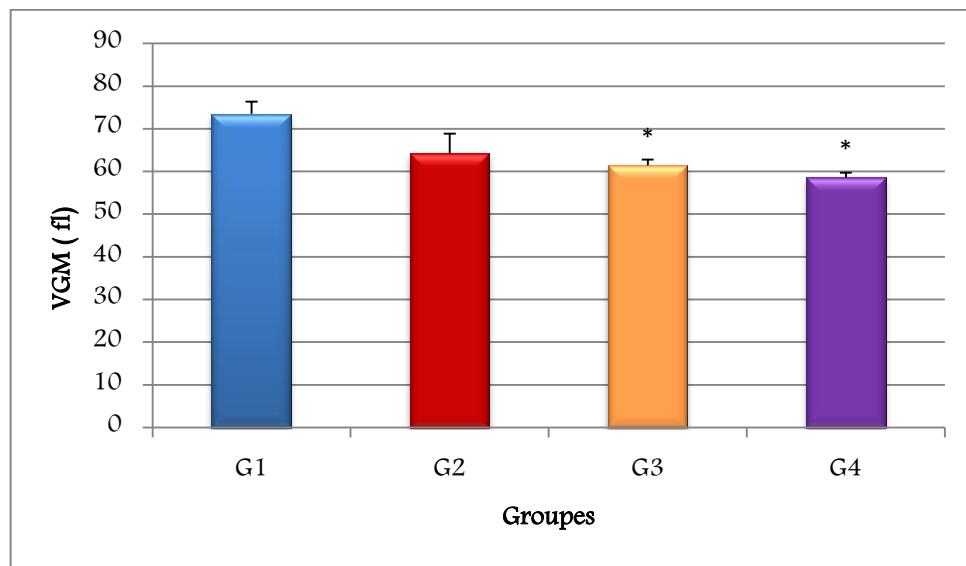


Figure 38 : Variation du volume globulaire moyen (fl) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

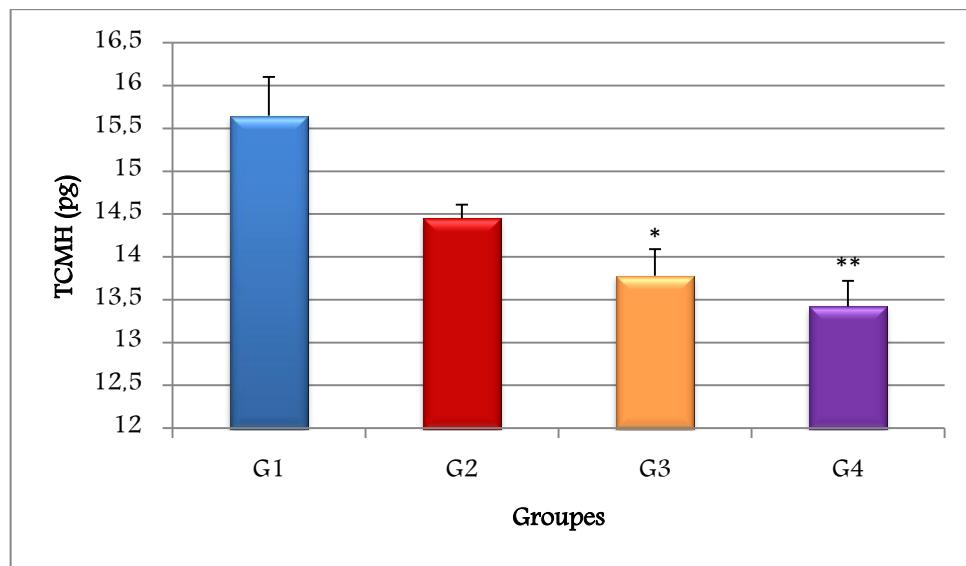


Figure 39 : Variation du ma teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (pg) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

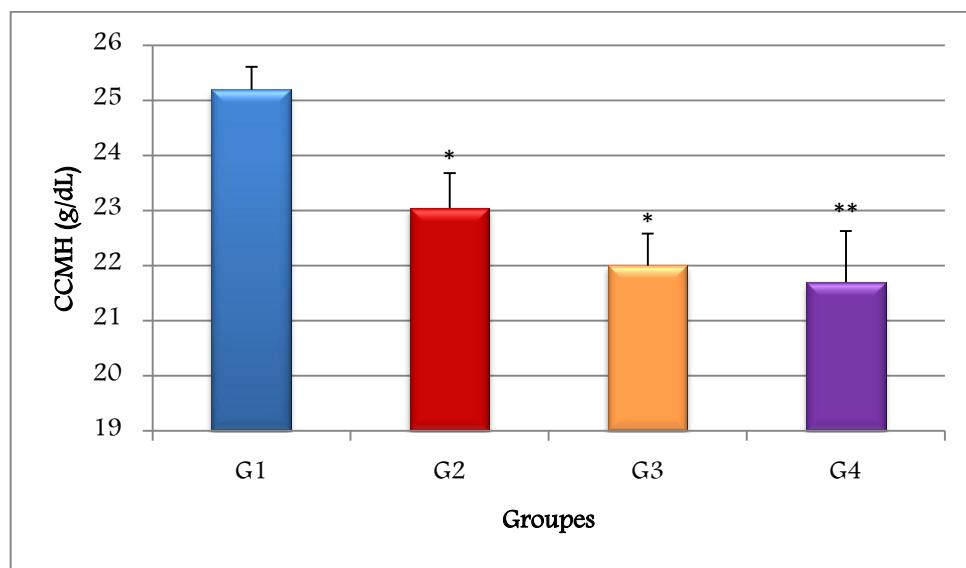


Figure 40 : Variation du taux de la CCMH (g/dL) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0.05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0.01$) : Différence hautement significative.

II.2.4. Influences du traitement sur les paramètres biochimiques

Les résultats illustrés dans le tableau 17 et les figures (41-48) et qui concernent le dosage des paramètres biochimiques affirment l'existence d'une grande perturbation métabolique. Après 03 semaines de traitement par le Brodifacoum, nous avons remarqué une diminution significative ($P \leq 0.05$) de la glycémie chez les lapins du groupe (G2), une diminution hautement significative ($P \leq 0.01$) chez le groupe (G3) et une diminution très hautement significative ($P \leq 0.001$) comparant au groupe témoin. Les mêmes constatations ont été enregistrées pour les triglycérides et le calcium. Nous avons remarqué aussi une augmentation hautement significative ($P \leq 0.01$) du cholestérol chez le groupe (G3) et une augmentation très hautement significative ($P \leq 0.001$) chez le groupe (G4) en comparaison avec les lapins témoins. Le dosage de l'urée a montré une augmentation significative

($P \leq 0,05$), hautement significative ($P \leq 0,01$) et très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les groupes (G2), (G3) et (G4), respectivement par rapport au groupe témoin. Quant à l'acide urique, les résultats ont montré une diminution significative ($P \leq 0,05$) chez les groupes (G2) et (G3), et une hautement significative ($P \leq 0,01$) chez le groupe G4 par rapport au groupe témoin. Le traitement par le Brodifacoum a entraîné une augmentation significative ($P \leq 0,05$) de la créatinine chez les lapins des groupes (G2) et (G3) et une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les lapins du groupe (G4) en comparant avec les lapins non traités.

Une diminution significative du phosphore chez les différents groupes traités par rapport au témoin est notée.

Tableau 17 : Variations des paramètres biochimiques chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

Groupes	G1	G2	G3	G4
Control	0,01 mg/kg/j	0,02 mg/kg/j	0,04 mg/kg/j	
Glucose (g/L)	1,444 \pm 0,0527	1,264 \pm 0,103*	1,146 \pm 0,104**	0,902 \pm 0,102***
Cholestérol (g/L)	0,58 \pm 0,0539	0,676 \pm 0,081	0,766 \pm 0,079**	0,912 \pm 0,089***
Triglycérides (g/L)	1,512 \pm 0,142	1,268 \pm 0,111*	1,106 \pm 0,0723**	0,722 \pm 0,129***
Acide urique (mg/L)	45,84 \pm 1,06	42,80 \pm 1,96*	40,06 \pm 3,00*	38,08 \pm 2,58**
Urée (g/L)	0,284 \pm 0,049	0,376 \pm 0,034*	0,422 \pm 0,037**	0,564 \pm 0,039***

Créatinine (mg/L)	7,014 \pm 0,677	8,050 \pm 0,553*	8,262 \pm 0,690*	10,220 \pm 0,419***
Calcium (mg/dL)	166,8 \pm 10,9	146,1 \pm 9,88*	132,3 \pm 11,1**	102,7 \pm 11,7***
Phosphore (mg/dL)	86,30 \pm 17,2	60,54 \pm 8,02*	56,26 \pm 8,89*	53,78 \pm 7,68*

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

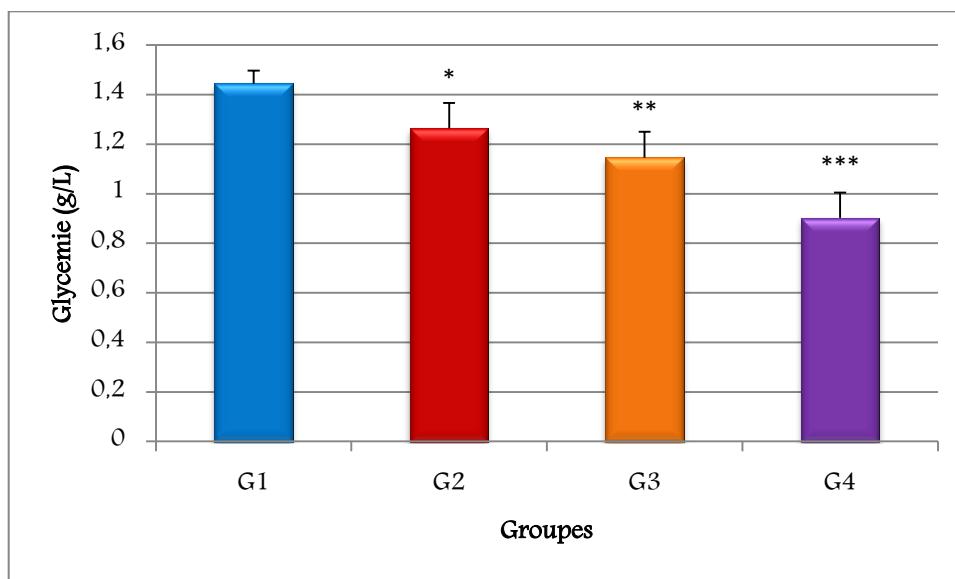


Figure 41 : Variation de la glycémie (g/L) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

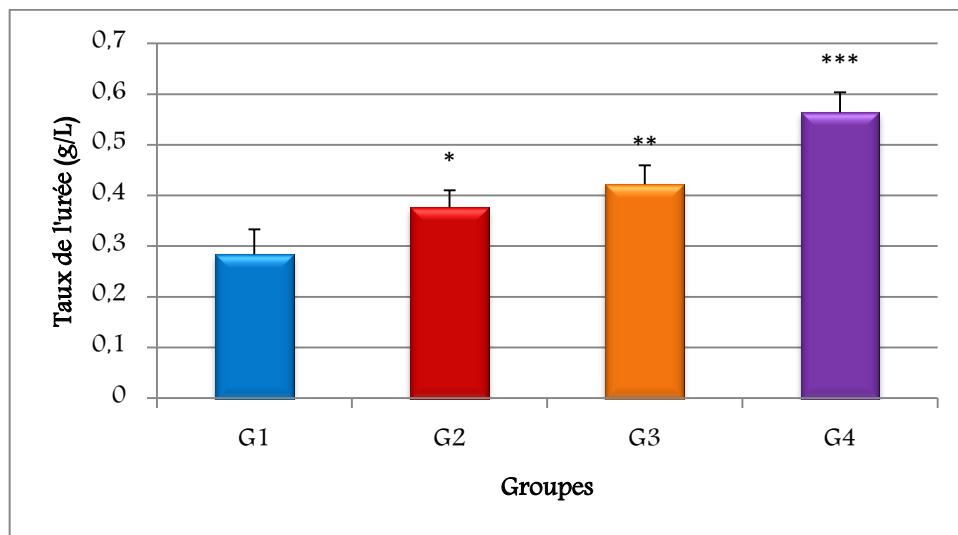


Figure 42 : Variation de la concentration sérique de l'urée (g/L) chez les lapins (G1)

témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0.05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0.01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0.001$) : Différence très hautement significative.

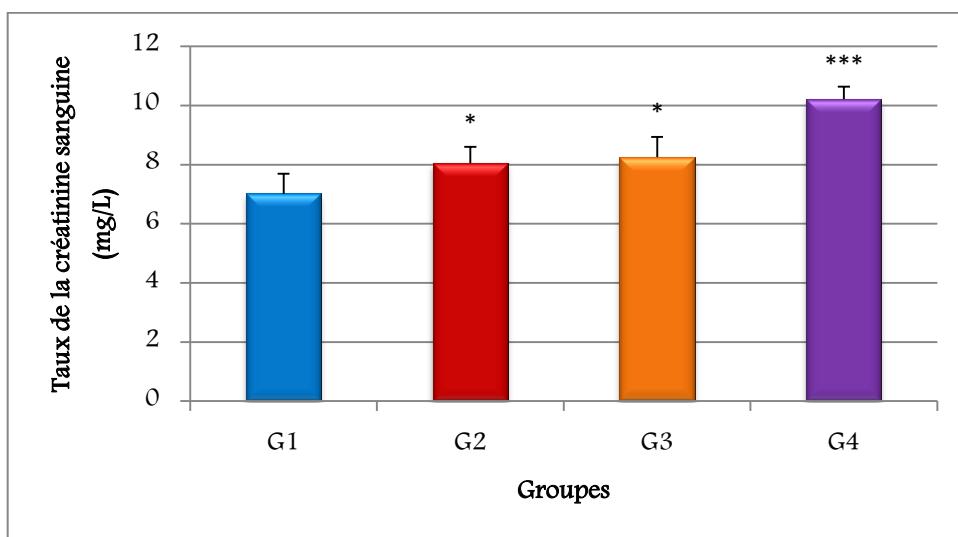


Figure 43 : Variation de la concentration sérique de la créatinine (mg/L) chez les lapins

(G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0.05$) : Différence significative.

*** ($P \leq 0.001$) : Différence très hautement significative.

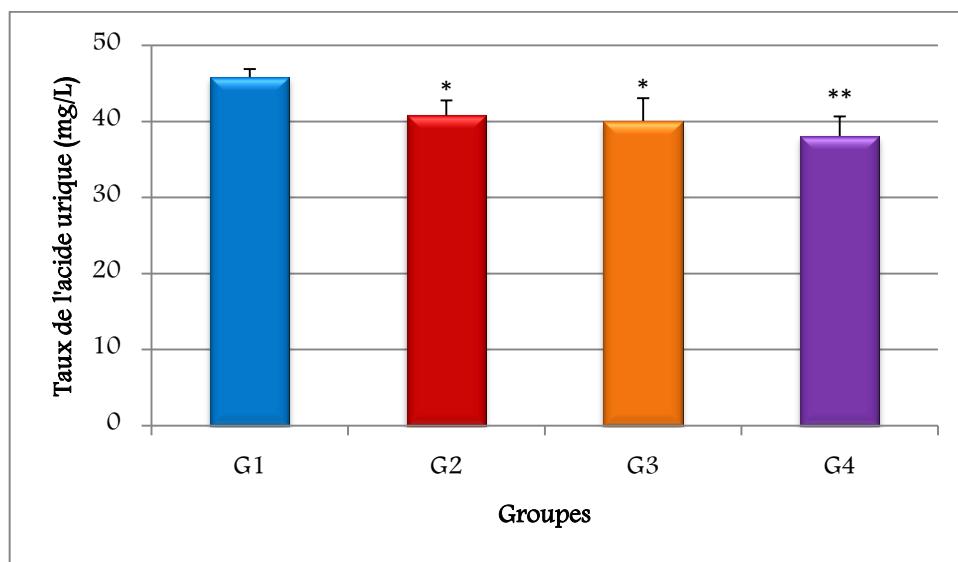


Figure 44 : Variation de la concentration sérique de l'acide urique (mg/L) chez les lapins

(G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

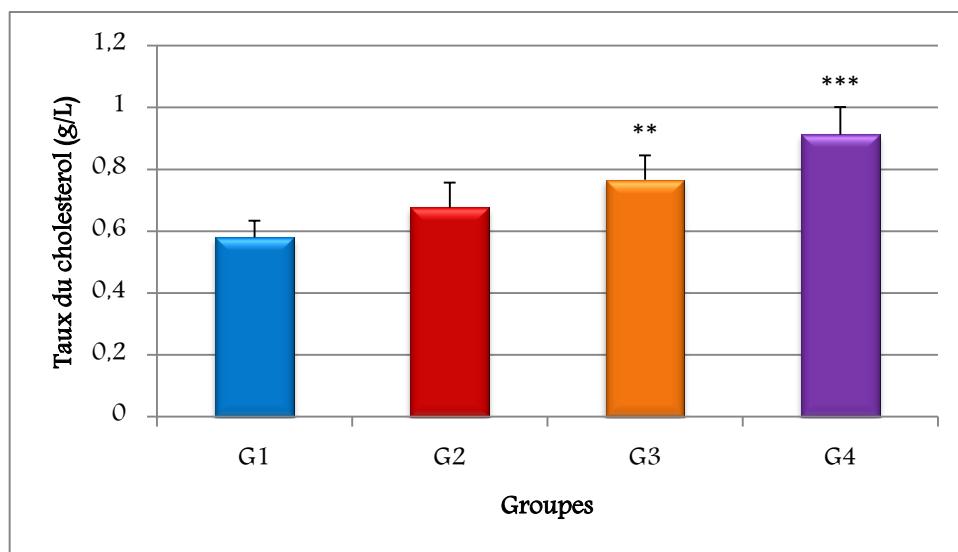


Figure 45 : Variation de la concentration sérique du cholestérol (g/L) chez les lapins (G1)

témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

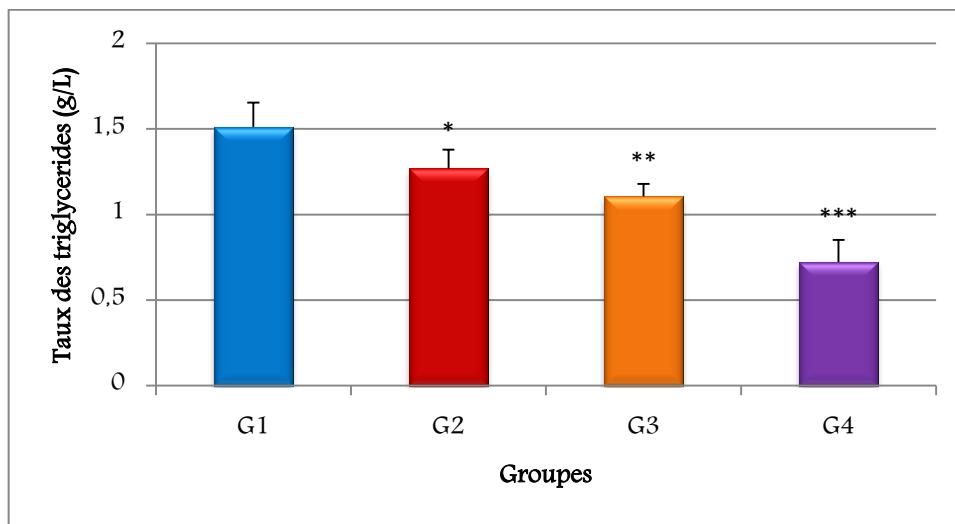


Figure 46 : Variation de la concentration sérique des triglycérides (g/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

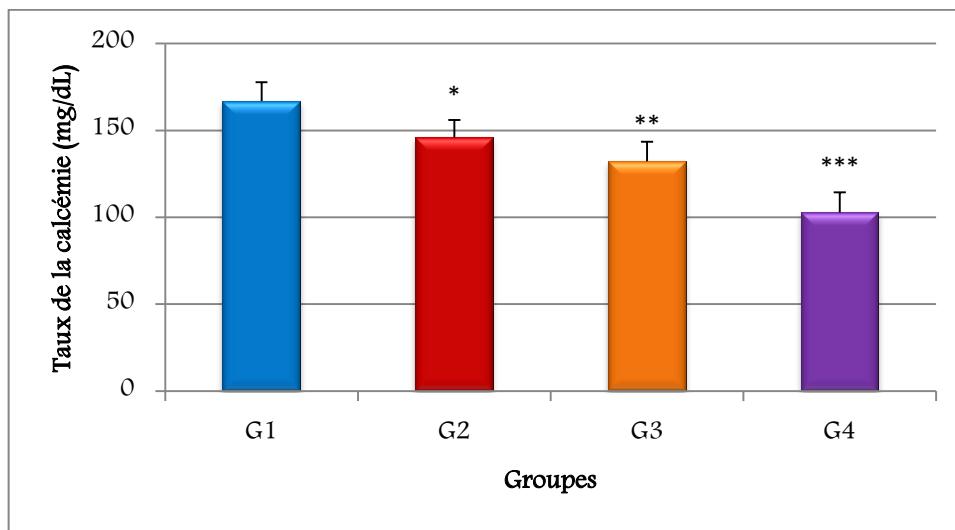


Figure 47 : Variation de la calcémie (mg/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

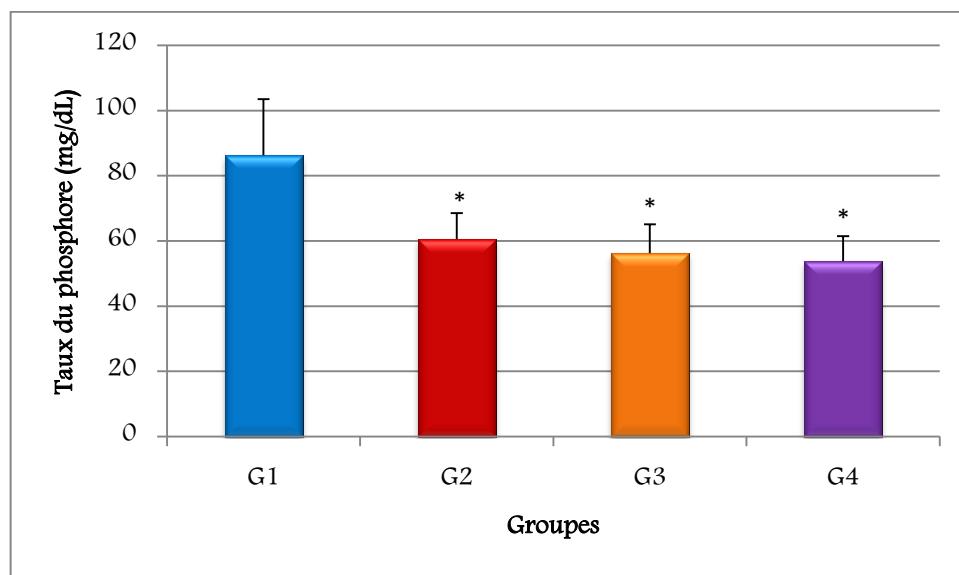


Figure 48 : Variation de la concentration sérique du phosphore (g/L) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

II.2.5. Influences du traitement sur la biologie des spermatozoïdes

II.2.5.1. Influences du traitement sur la vitesse des spermatozoïdes

Le traitement des lapins par le Brodifacoum à raison de 0,01, 0,02 et 0,04 mg/kg/j entraîne une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les lapins du deuxième groupe (G2) et très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les lapins des deux autres groupes traités (G3 et G4) de la vitesse des spermatozoïdes tout en comparant aux lapins témoins (tableau 18 ; figure 49).

Tableau 18 : Variations de la vitesse des spermatozoïdes ($\mu\text{m/sec}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

Groupes	G1	G2	G3	G4
Vitesse ($\mu\text{m/sec}$)	36,46 \pm 4,98	25,80 \pm 2,10**	16,11 \pm 1,06***	13,77 \pm 0,80***

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence hautement significative.

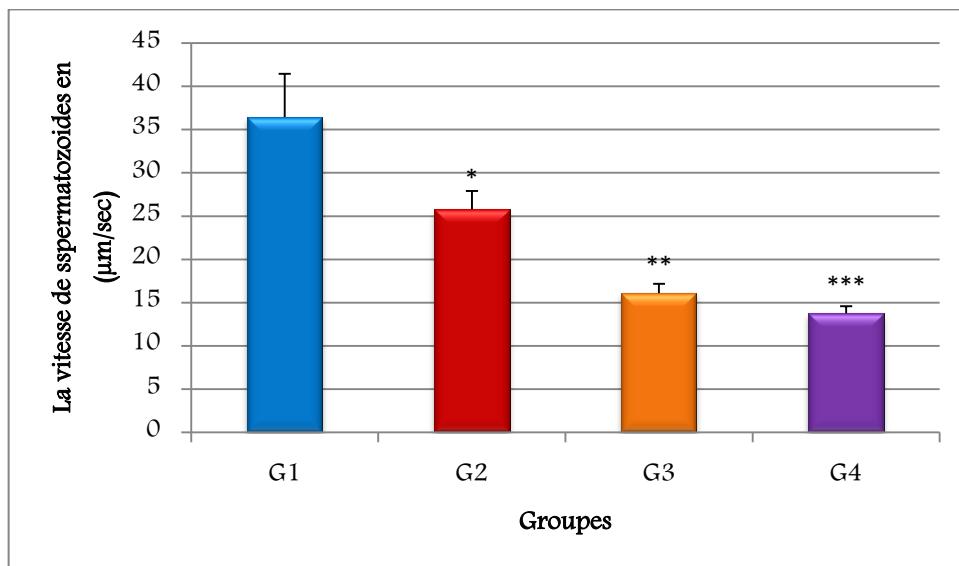


Figure 49 : Variation de la vitesse des spermatozoïdes ($\mu\text{m/sec}$) chez les lapins (G1)

témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

II.2.5.2. Influences du traitement sur la mobilité des spermatozoïdes

D'après les résultats illustrés dans le tableau 19 et la figure 50, nous notons une diminution significative ($P \leq 0,05$), hautement significative ($P \leq 0,01$) et très hautement significative ($P \leq 0,001$) de la mobilité des spermatozoïdes chez lapins traités des groupes (G2, G3) et (G4) respectivement en comparaison avec les témoins.

Tableau 19 : Variations de la mobilité (%) des spermatozoïdes chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

Groupes	G1	G2	G3	G4
Mobilité (%)	70 \pm 7,07	56,73 \pm 3,27*	49,33 \pm 1,9**	40,33 \pm 4,32***

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

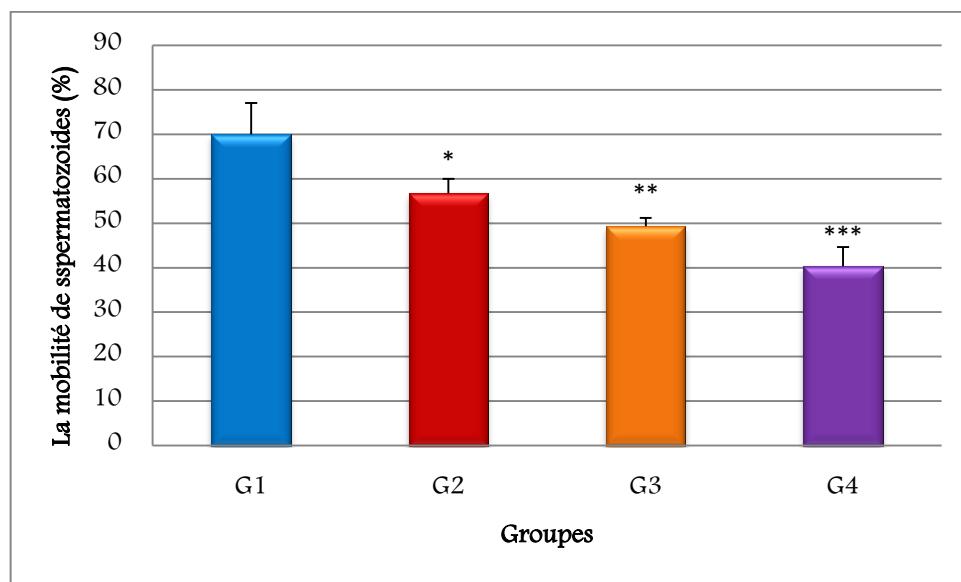


Figure 50 : Variation de la mobilité des spermatozoïdes (%) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

II.2.5.3. Influences du traitement sur la concentration des spermatozoïdes

Les résultats obtenus montrent une diminution significative ($P \leq 0,05$) de la concentration des spermatozoïdes chez le groupe G2 par le Brodifacoum, par rapport au groupe témoin. Une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) a été enregistrée chez le groupe (G3), et une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) est notée chez le groupe (G4) par rapport au groupe témoin (tableau 20 ; figure 51).

Tableau 20 : Variations de la concentration des spermatozoïdes ($\times 10^6/\text{mL}$) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

Groupes	G1	G2	G3	G4
Concentration ($10^6/\text{mL}$)	430 \pm 40,6	364,5 \pm 29,7*	268 \pm 47,9***	191 \pm 30,4***

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

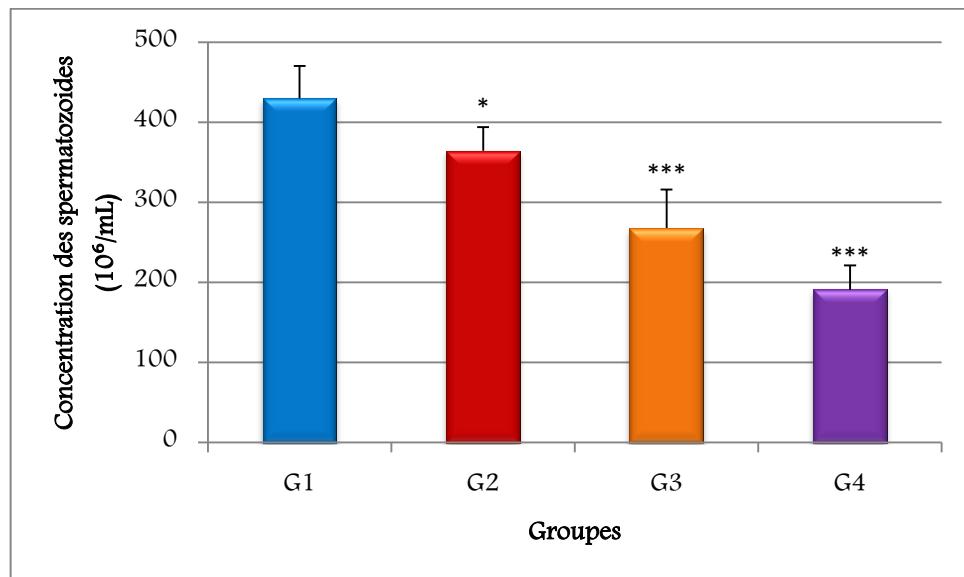


Figure 51 : Variation de la vitesse des spermatozoïdes ($10^6/\text{mL}$) chez les lapins (G1)

témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

*** ($P \leq 0,001$) : Différence très hautement significative.

II.2.5.4. Influences du traitement sur la vitalité des spermatozoïdes

➤ Coloration vitale

Le tableau 21 et la figure 52 révèlent une diminution significative ($P \leq 0,05$) du taux des spermatozoïdes vivants chez les lapins du groupe (G3) et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez ceux du groupe (G4) par rapport au groupe témoin. Cependant, une augmentation significative ($P \leq 0,05$) du taux des spermatozoïdes non-vivants a été constatée chez le groupe (G3) et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez le groupe (G4) en comparant au témoin.

Tableau 21 : Variations de la vitalité (%) (test d'éosine 1%) des spermatozoïdes chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

Groupes		Test d'éosine (%)
G1	V	68 \pm 2,74
	NV	32 \pm 2,74
G2	V	69,44 \pm 2,72*
	NV	30,56 \pm 2,72
G3	V	64,59 \pm 1,46*
	NV	64,59 \pm 1,46*
G4	V	64,59 \pm 1,46**
	NV	64,59 \pm 1,46**

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

v : spermatozoïdes vivants ; nv : spermatozoïdes non-vivants.

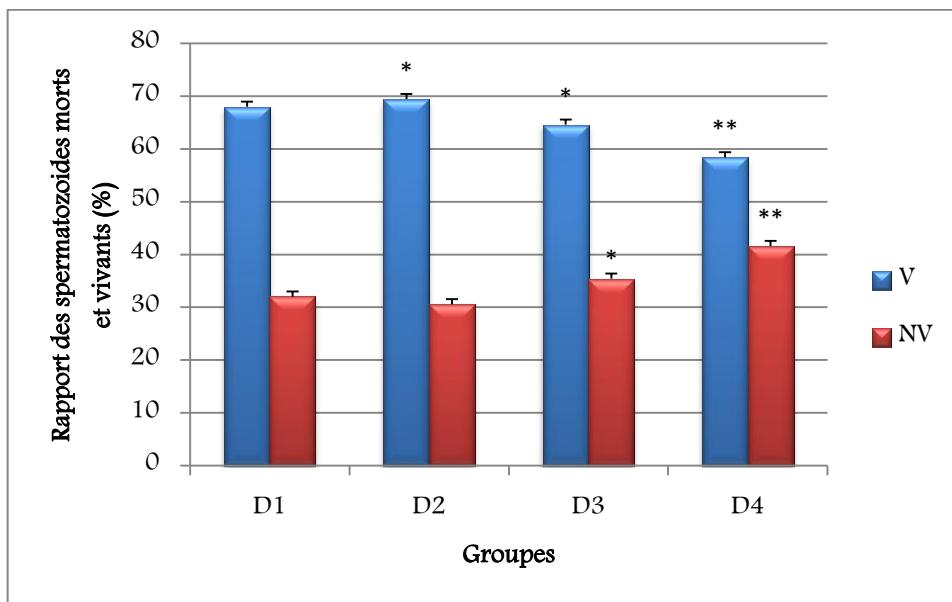


Figure 52 : Variation du taux de vitalité (test d'éosine 1%) des spermatozoïdes (%) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,01$) : Différence hautement significative.

➤ Test hypo-osmotique

Les résultats obtenus du test hypo-osmotique montrent une diminution significative ($P \leq 0,05$) des malformations de type (B) chez tous les groupes traités par rapport au témoin. Une diminution significative ($P \leq 0,05$) des malformations de type (C) chez le groupe (G4) a été observée en comparant au témoin. Néanmoins, une augmentation significative ($P \leq 0,05$) du taux des spermatozoïdes normaux chez le groupe (G3), et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez le groupe (G4) ont été enregistrées en comparaison au groupe témoin (tableau 22 ; figure 53).

Tableau 22 : Variations de la vitalité (malformations) des spermatozoïdes (%) chez les lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 07 lapins).

Groupes	Type de malformation	Taux de malformation (%)
G1	A	39,60 \pm 4,56
	B	24 \pm 2,74
	C	6,00 \pm 1,22
	N	30,20 \pm 3,93
G2	A	40,15 \pm 2,48
	B	20,22 \pm 1,57*
	C	5,91 \pm 2,36
	N	33,71 \pm 1,63*
G3	A	36,59 \pm 1,71
	B	20,36 \pm 3,54
	C	6,23 \pm 1,05
	N	36,28 \pm 3,26*
G4	A	36,39 \pm 4,00
	B	18,14 \pm 3,33*
	C	3,88 \pm 1,54*
	N	41,57 \pm 1,07**

* ($P \leq 0,05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0,001$) : Différence hautement significative.

A : malformation de type (A) ; B : malformation de type (B) ; C : malformation de type (C) ; N : spermatozoïdes normaux.

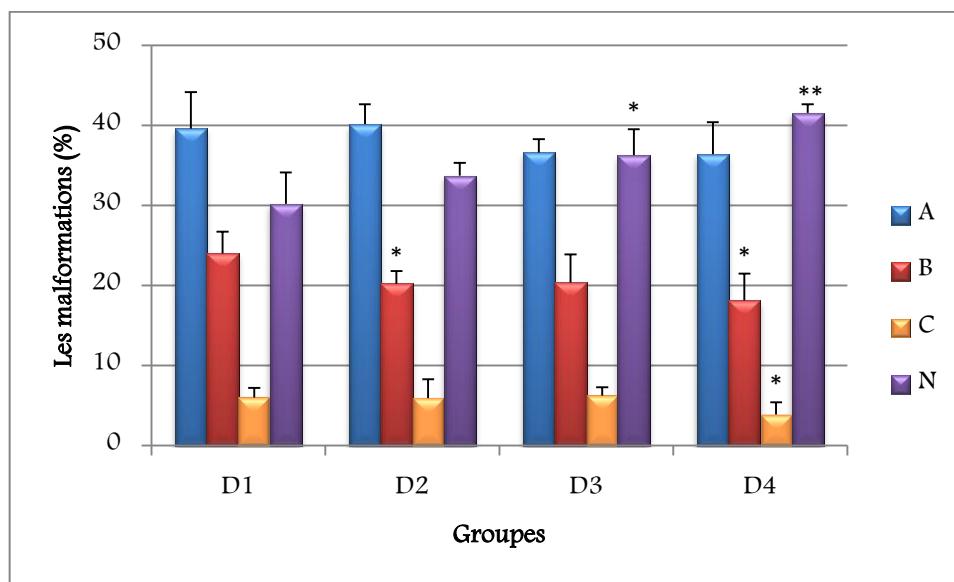


Figure 53 : Variation du taux de vitalité (les malformations) des spermatozoïdes (%) chez les lapins (G1) témoins et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement.

* ($P \leq 0.05$) : Différence significative.

** ($P \leq 0.001$) : Différence hautement significative.

II.2.5.5. Influences du traitement sur l'histologie

a. Coupes histologiques testiculaires

L'étude histologique des testicules des lapins du groupe témoin indique un aspect normal du tissu testiculaire avec la présence des spermatozoïdes au niveau des tubes séminifères (figure 54G1). Par contre, chez les lapins traités par le Brodifacoum, des altérations ont été observées comparés aux témoins. Dans notre étude, les lapins traités par le Brodifacoum montrent des changements histologiques altérant essentiellement l'architecture et la fonction testiculaire caractérisés par une atrophie (figure 54G2) accompagnée d'une diminution du diamètre des tubes séminifères ; une faible densité du sperme dans la lumière (figure 54G3) ; des altérations dégénératives au niveau de l'épithélium séminale,

désorganisation et destruction des cellules germinales, de Sertoli et de Leydig (figure 54G4).

L'atrophie est légèrement plus intense chez les lapins traités par 0,02 et 0,04 mg/kg/j de Brodifacoum en comparaison aux lapins témoins. L'observation microscopique des testicules des lapins traités à raison de 0,04 mg/kg/j montre des tubes séminifères vides.

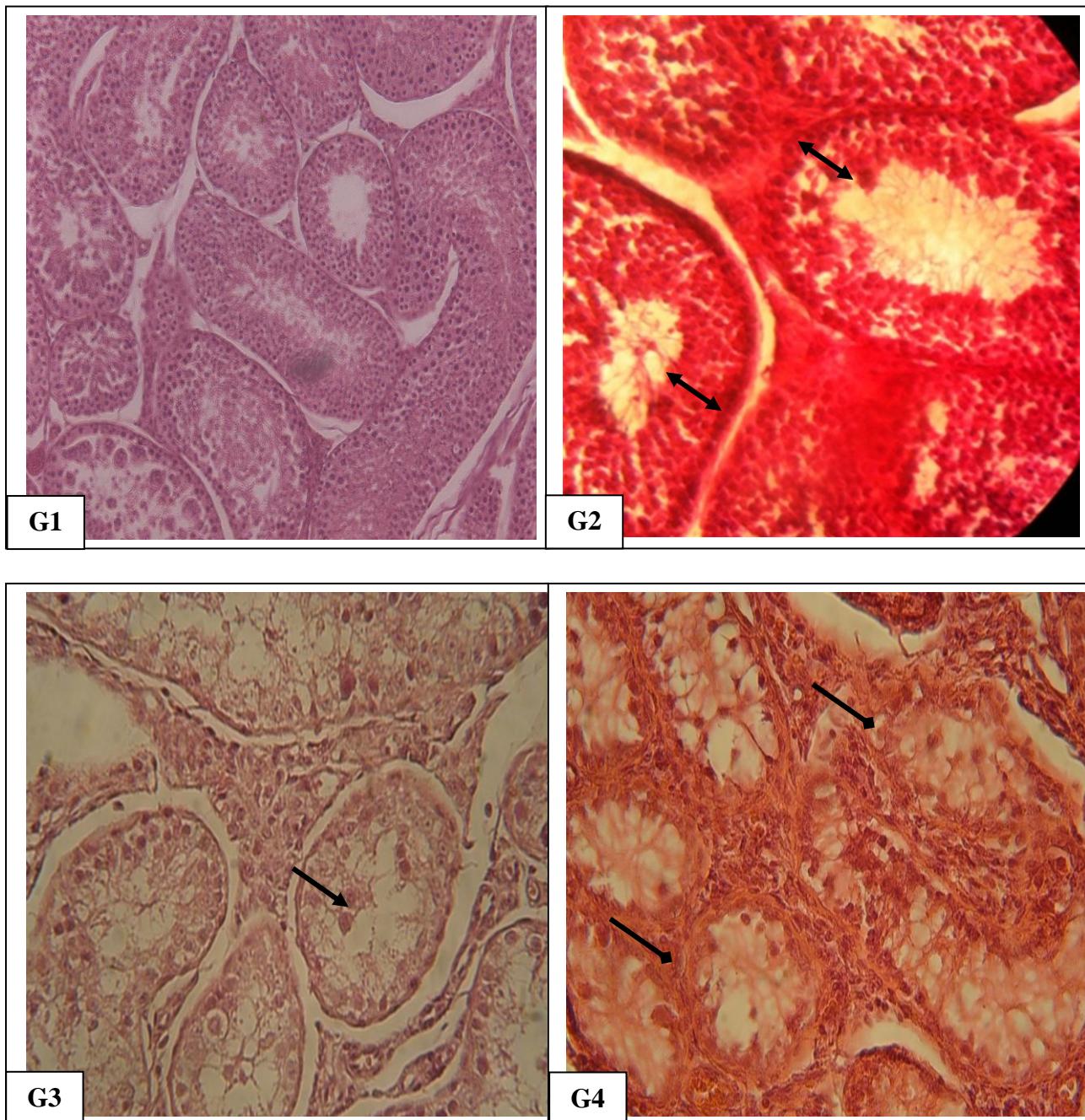


Figure 54 : Coupes histologiques des testicules des lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement : (↔) atrophie, (→) lumière vide, (→) désorganisation et destruction des cellules germinales (400×).

b. Coups histologiques hépatiques

L'observation microscopique des coupes histologiques hépatiques des lapins révèle une structure normale du foie chez les témoins (figure 55G1). L'exposition des lapins au Brodifacoum a induit des modifications dégénératives dans le foie. En fait, le Brodifacoum a provoqué une dilatation du parenchyme ainsi qu'une congestion cellulaire (figure 55G2). Chez les lapins traités aux doses de 0,02 et 0,04 mg/kg/j les coupes histologiques indiquent des signes de nécrose (figure 55G3, 55G4). Une vacuolisation des hépatocytes était également évidente dans le groupe traité par la plus forte dose (figure 55G4) en comparaison avec le groupe témoin.

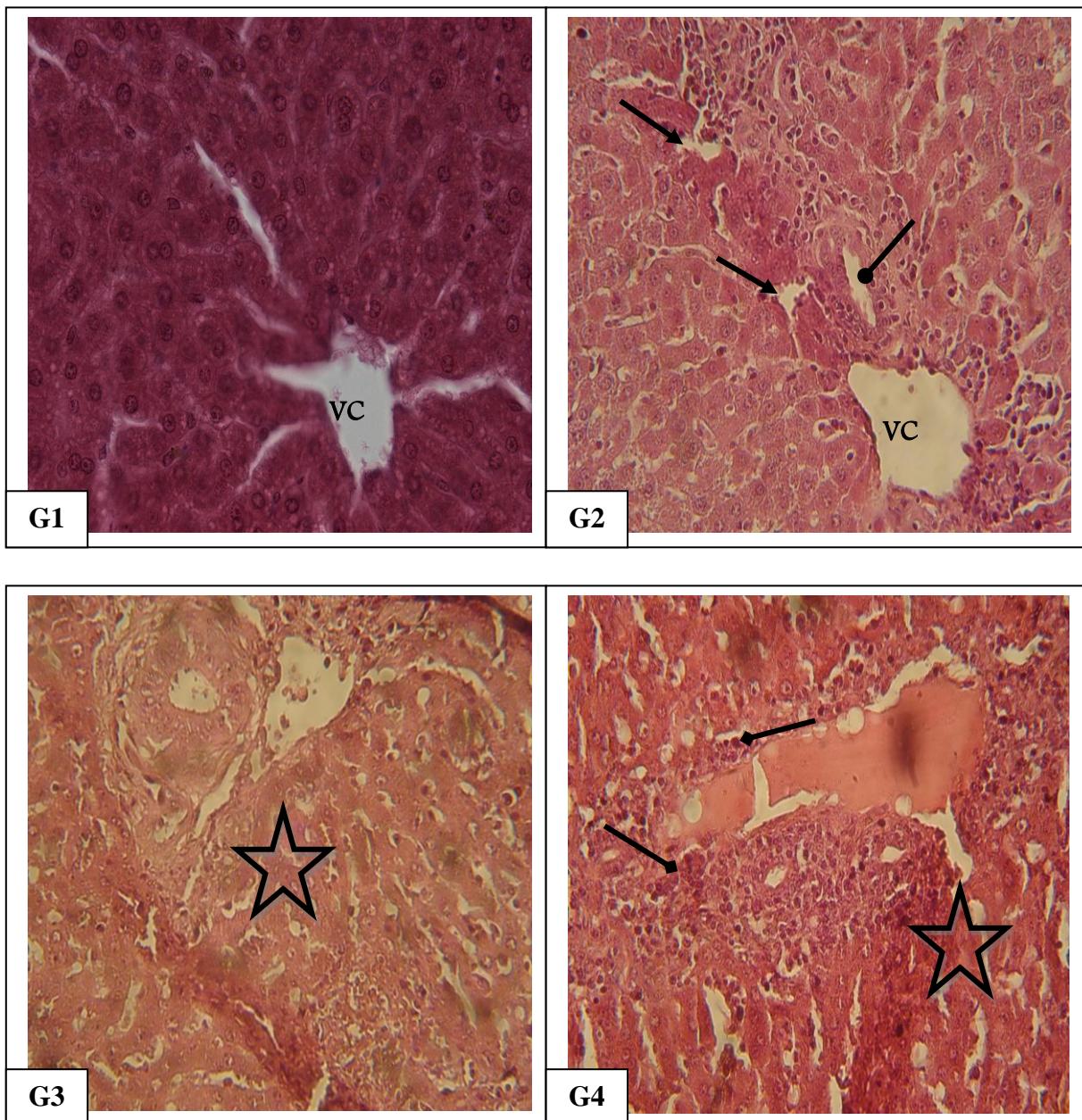


Figure 55 : Coupes histologiques hépatiques des lapins témoins (G1) et traités (G2, G3 et G4) après 03 semaines de traitement : (→) vacuolisation, (●) dilatation du parenchyme (★) nécrose, (→) congestion cellulaire, VC : veine centrolobulaire (400 \times).

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

DISCUSSION

II.3. Discussion

Les rongeurs peuvent constituer des réservoirs pour différentes maladies transmissibles à l'homme (maladies à transmission vectorielle telles que la leptospirose, la peste, le virus des fièvres hémorragiques à syndrome rénal, l'échinococcosis alvéolaire, ...etc) (Treml *et al.*, 2002 ; Le louarn et Quéré, 2003 ; Pejcoch et Kriz, 2006). Par exemple, les populations urbaines de rats peuvent présenter des densités de 2 à 3 rats par habitant (OMS, 1982). Leur nourriture y est en effet abondante et leur statut anthropophile renforce alors le problème de santé publique. De plus, parmi les pestes agricoles, les rongeurs sont les seuls responsables d'importantes pertes économiques (Riba et Silvy, 1989), tant sur les dommages aux cultures sur pieds qu'aux denrées alimentaires stockées. La lutte contre les rongeurs apparaît de ce fait indispensable et fait intervenir plusieurs méthodes biologiques (en favorisant les prédateurs) ou physiques (piégeage). Cependant, la lutte chimique à l'aide d'anticoagulants reste principale. Les anticoagulants de la seconde génération (SGARs) sont connus pour avoir une persistance dans les tissus animaux beaucoup plus longue (OMS, 1995 ; Erickson et Urban, 2002) et leur impact négatif sur la faune non-cible a été rapporté dans le monde entier (à titre d'exemple en Angleterre : Shore *et al.*, 1996 ; McDonald *et al.*, 1998, Shore *et al.*, 2003 ; en France : Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004 ; Lambert *et al.*, 2007 ; aux USA : Stone *et al.*, 2003 ; Nouvelle Zélande : Eason *et al.*, 2002). Ces intoxications peuvent être de trois natures. Elles sont dites primaires lorsqu'elles interviennent à la suite de consommation directe d'appâts empoisonnés, secondaires, par consommation de cadavres ou de proies vivantes intoxiquées ou encore tertiaires résultant du transfert des anticoagulants à travers la chaîne alimentaire. Ces intoxications concernent de nombreuses espèces d'oiseaux ou de mammifères dont certaines sont protégées voire classées dans la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) comme

potentiellement menacées avec par exemple le Milan Royal en Europe (Pain *et al.*, 2007 ; Berny et Gaillet, 2008) et le Puma en Amérique (Riley *et al.*, 2007). Certaines des espèces concernées par ces intoxications sont considérées comme en danger d'après l'IUCN avec par exemple le Vison d'Europe (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004).

Le Brodifacoum, anticoagulant dit de seconde génération, est inscrit dans l'annexe I de la directive européenne 98/8/CE. Du point de vue réglementaire il est donc considéré comme à la fois un produit « phytosanitaire » protégeant les végétaux mais aussi comme un « biocide antiparasitaire » pour lutter contre les souris, les rats ou autres rongeurs de milieux non agricoles. En induisant de nombreux cas d'intoxication de la faune non cible (Davidson et Armstrong, 2002 ; Dowding *et al.*, 2010) et en présentant des enjeux bien souvent conflictuels, son utilisation pour contrôler les populations de rongeurs de prairie illustre la problématique du transfert des pesticides dans les réseaux trophiques. La contamination de l'environnement a été constatée notamment par l'observation d'une diminution spectaculaire de densités relatives de renards (pouvant s'apparenter à une espèce « sentinelle ») dans les zones traitées, suggérant une mortalité importante, ou encore, par le monitoring du Brodifacoum dans les cadavres collectés en nature. L'American Environmental Protection Agency soulignait dès 1998 (USEPA, 1998) l'urgence de développer des recherches *in situ* sur l'évaluation du risque environnemental lié à l'utilisation des raticides chimiques et notamment la nécessité de comprendre comment ils sont transférés dans les écosystèmes. Comme souligné précédemment, ces connaissances sont fondamentales pour comprendre les processus de transfert de la molécule vers la faune non-cible et évaluer puis gérer les risques liés à son utilisation.

Le Brodifacoum a été introduit après 1983. De 1983 à 1994, 40 cas d'empoisonnement d'animaux domestiques et de ferme ont résulté de l'utilisation de composés de la deuxième

génération d'anticoagulants et 17 cas étaient dus à l'ingestion de ceux de la première génération (Hoogenboom, 1994).

La DL₅₀ par voie orale du Brodifacoum chez le rat est de 0,26 mg/kg (Redfern *et al.*, 1976).

La toxicité aiguë par voie orale (DL₅₀ mg/kg) de Brodifacoum chez le lapin mâle est de 0,29 mg/kg (Hadler, 1975a, 1975b ; Parkinson, 1975, 1976 ; Godfrey, 1984, 1985).

Nos observations indiquent que le traitement des lapins au Brodifacoum pour la période de trois semaines a provoqué une diminution remarquable de l'activité des animaux. Ce résultat concorde parfaitement avec ceux de Mason et Littin (2003) et Valchev *et al.* (2008) qui ont noté que l'utilisation du Brodifacoum par voie orale a causé plusieurs symptômes cliniques tels que la somnolence, la faiblesse, un manque ou une diminution de l'appétit (anorexie), avec une diminution de la locomotion et un épuisement rapide et facile. Les mêmes observations ont été notées par Littin *et al.* (2002) après le traitement des rats et des opossums par une dose de Brodifacoum de 0,5 mg/kg.

Durant le traitement, nous avons enregistré aussi un taux de mortalité (28,5 %) (2 lapins /7) chez le groupe traité par la plus forte dose de Brodifacoum (0,04 mg/kg/j). le même résultat a été noté par une autre étude où des décès de moutons ont été enregistrés après le traitement par le Pindone (raticide anticoagulant de la troisième génération) à raison de 15 mg/kg pendant 3 jours, puis, une deuxième exposition après 8 jours (Robinson *et al.*, 2005).

De plus, des rats *Wistar* (mâles et femelles) ont été constamment soumis à un régime contenant du Brodifacoum à 0,1 mg/kg du poids corporel, pendant 12 semaines. Hadler, 1976 a montré que la mortalité s'est produite chez 9 moutons sur 20 chez les mâles et 5 sur 20 chez les femelles traités toujours au Brodifacoum par voie orale. Dans une étude, la toxicité des doses simples et multiples de Pindone aux lapins et aux moutons ont été comparées. Des décès se sont produits aux expositions orales simples au niveau des doses de

6,6 et 75 mg/kg chez les lapins et les moutons, respectivement. Les animaux sont morts 7-10 jours après la première dose en raison de l'hémorragie répandue dans tous les muscles et quelques organes (Oliver et Wheeler, 1978). Nos résultats révèlent une diminution du poids corporel des lapins traités par le Brodifacoum. Les mêmes constatations ont été obtenues par Boermans *et al.* (1991) après l'administration du Brodifacoum aux chevaux à 0,125 mg/kg pendant 21 jours. Naz *et al.* (2011) ont également remarqué une diminution du poids corporel des rats recevant des granules qui contiennent du Brodifacoum. Les résultats obtenus montrent aussi une diminution du poids relatifs des testicules et des épидidymes après le traitement par le Brodifacoum. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Mohammed et Kadhim (2006). Ils ont remarqué une diminution du poids des testicules et des épидidymes chez les rats traité par des doses de . 50, 75 et 100 ppm de Brodifacoum pendant 10 jours. Cependant, une augmentation du poids relatif du foie est du cœur a été enregistrée chez les lapins traités par rapport aux témoins. Ces résultats sont similaires à ceux de Naz *et al.* (2011) après le traitement des rats par le Brodifacoum. Eason *et al.* (2002) ont constaté que le traitement des rats par 0,25 mg/kg/jours de mono-fluoroacétate de sodium, un rodenticide de la deuxième génération comme le Brodifacoum, les poids du cœur, du foie et des reins ont été considérablement augmentés. Ces résultats sont tout à fait conformés à nos résultats, cette augmentation pourrait être due à l'inflammation

et à l'accumulation des substances toxiques dans ces organes qui sont les principaux organes cibles des toxines (Eason *et al.* 2002). Plusieurs études ont démontré que même des doses sub-létales des SGARs peuvent provoquer des anomalies physiologiques (y compris la diminution statistiquement significative du poids corporel (Littin *et al.*, 2002).

l'augmentation de la taille du foie, du cœur et des reins). Selon Eason *et al.* (2000b), la diminution du poids corporel peut être expliquée par la diminution de l'appétit.

Paramètres hématologiques

Les résultats de la présente étude ont montré que le traitement des lapins par les différentes doses du Brodifacoum a causé une augmentation significative des globules blancs (GB), les granulocytes (Gr), les lymphocytes (LY) et les monocytes (MO) avec une diminution significative dans les globules rouges (GR), le taux de prothrombine (TP), l'hémoglobine (Hb), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), le volume globulaire moyen des hématies (VGM), es plaquettes (PLT) et les hématocrites (Ht) chez les groupes traités par rapport au groupe témoin.

Ces résultats obtenus sont en accord total avec d'autres études où il a été rapporté que le système cible des raticides anticoagulants est le système hématologique, avec l'affaiblissement de la coagulation (OMS, 1995). Des auteurs ont suggéré que le Brodifacoum agit par inhibition de la vitamine K époxyde réductase dans le cycle de la vitamine K₁-époxyde (Park *et al.*, 1986).

Dans les conditions physiologiques, l'oxydation de la vitamine K dans les hépatocytes est couplée à une étape de carboxylation essentielle pour l'activation des facteurs de prothrombine à partir des précurseurs inactifs (Voils, 2007). Le Brodifacoum provoque l'hypoprothrombinémie car la réaction de carboxylation couplée est inhibée (Lipton et Klass, 1984). L'augmentation de la concentration des leucocytes après l'administration du Brodifacoum peut être expliquée par le fait qu'ils représentent la première ligne de défense dans l'organisme. En outre, une externe hémorragie a été observée chez les lapins traités, ce qui explique la réduction constatée dans les globules rouges, l'hémoglobine et les hématocrites.

Un allongement du temps de coagulation a été montré sur des bovins adultes et sur des veaux après administration intra ruminale de 1 mg/kg de Diphénadione (Elias *et al.* 1978).

Une étude de Boermans *et al.* (1991) sur les chevaux a démontré que le traitement par le Brodifacoum à 0,125 mg/kg pendant 21 jours a provoqué une diminution du taux des globules rouges, de l'hémoglobine, des hématocrites et des plaquettes. Une augmentation du taux de prothrombine a été également prouvée. Des travaux de Revathi et Yogananda (2006) ont démontré des changements hématologiques révélés par une réduction marquée des taux de : Hb, RBC, LY et des plaquettes chez les animaux traités par la Bromadiolone.

Kohtrula *et al.*, (1989) ont rapporté une augmentation du taux des globules blancs quand des souris ont été traitées avec le Nivalenol. Des doses quotidiennes de 0,3 à 2,5 mg/kg de Pindone pendant 4-5 jours consécutifs à des chiens, chats, chèvres, chats, bétail, chevaux, et poules a causé une augmentation significative du taux de prothrombine chez toutes les espèces excepté les chevaux (Martin *et al.*, 1991). L'exposition des lapins au Pindone à 25 mg/kg a réduit de manière significative le taux d'hématocrites. D'ailleurs, le taux de prothrombine a significativement été augmenté (Eason et Jolly, 1993).

Les mêmes résultats ont été obtenus par Mosterd et Thijssen (1991), qui ont observé une augmentation du taux de prothrombine chez les rats après l'administration de 0,2 mg/kg du Brodifacoum par voie orale. Chez les êtres humains, une étude rétrospective de Yu *et al.* (2013) a démontré aussi une diminution du TP chez des patients empoisonnés par un rodenticide à base de Brodifacoum et de Bromadiolone. Une étude d'un cas clinique a montré également une prolongation du temps de prothrombine chez un homme empoisonné par le Brodifacoum.

Paramètres biochimiques

L'analyse des paramètres biochimiques chez les différents groupes a une valeur importante dans l'évaluation toxicologique étant donné que les modifications apparaissent avant que les symptômes cliniques se produisent par les substances toxiques (Rao, 2006).

Les résultats des paramètres biochimiques chez les lapins traités, montrent d'une part une diminution significative de la concentration sérique du glucose, de l'acide urique, des triglycérides, du calcium et du phosphore par rapport aux témoins ; d'autre part une augmentation du taux du cholestérol, de l'urée et de la créatinine principalement pour les lapins traités à la dose la plus forte toujours en comparaison au groupe témoin. Ces variations peuvent être expliquées par l'effet du Brodifacoum sur l'activité des enzymes peptidases, protéases et lipases et certainement sur le métabolisme et la synthèse de ces paramètres.

Les mêmes résultats ont été obtenus par Naz *et al.* (2011), chez les rats après l'administration du Brodifacoum pendant 14 jours. La diminution du taux du glucose chez les lapins traités peut être expliquée par la diminution de la consommation de la nourriture chez les lapins (Naz *et al.*, 2010, 2011).

Les résultats obtenus fait preuve d'un trouble de la fonction rénale révélée par une augmentation des concentrations de l'urée et de la créatinine, et une diminution des concentrations de l'acide urique. La fonction la plus importante du rein est de maintenir un état physiologique normal du corps. L'insuffisance rénale est principalement provoquée par les produits toxiques qui interfèrent avec cette fonction. L'ingestion d'une telle substance chimique engendre un déséquilibre électrolytique constamment associé à une dégénération tubulaire aiguë qui peut finalement mener à un désordre rénal. La molécule toxique présente dans la Bromadiolone diminue la capacité d'excrétion du rein (Revathi et

Yogananda, 2006). Woody *et al.* (1992) ont observé une demi-vie d'élimination du Brodifacoum dans le sérum de 6 ± 4 jours chez quatre chiens.

De même, plusieurs auteurs ont montré que le Brodifacoum a causé un dysfonctionnement rénal révélé par une perturbation dans les paramètres rénaux (Binev *et al.*, 2005 ; Valchev *et al.*, 2008). L'augmentation des taux sériques en l'urée et en créatinine, et la diminution en l'acide urique chez les lapins traités par le Brodifacoum, sont considérées comme des biomarqueurs du dysfonctionnement rénal et les dommages rénaux provoqué par le Brodifacoum. L'urée et la créatinine ce sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (Finco, 1997). Hussain *et al.* (2013) ont démontré une augmentation du taux sérique en créatinine après l'administration de Malathion, un pesticide largement utilisé dans l'agroproduction et la santé publique, chez les cailles à plusieurs doses pendant 51 jours.

Peu d'études ont été rapportées que les anticoagulants de la seconde génération sont principalement éliminés en tant que composés inchangés (OMS, 1995 ; Lodal et Hansen, 2002). La faible excrétion urinaire empêche l'isolement des métabolites de l'urine (Erichsen *et al.*, 1993).

La diminution du taux de calcium sérique chez des lapins traités a montré l'effet toxique du Brodifacoum sur le métabolisme du calcium. Le Brodifacoum peut agir comme un substitut de calcium dans le métabolisme du second messager, il réduit les facteurs de coagulation du sang, car certains d'entre eux, portent des résidus gamma-carboxylés qui leur permettent de fixer le calcium et d'être liés aux membranes phospholipidiques (Roch, 2008). Il s'agit de facteurs II, VII, X, IX.

Une première étude rapportée par Petterino et Biancardi (2001) a consisté à administrer à des chèvres une dose de 0,05 à 0,1 mg/kg de Flocoumafène une fois par semaine pendant 3

mois. Une augmentation des paramètres biochimiques tels que l'aspartate transaminase, la phosphatase alkaline, la bilirubine et la créatinine et une diminution des protéines totales traduit l'augmentation de l'activité du foie et d'autres organes. Plusieurs études ont démontré que même des doses sub-léthales des SGARs peuvent causer des anomalies biochimiques (y compris le glucose et les marqueurs de la fonction hépatique) (Binev *et al.*, 2005 ; Valchev *et al.*, 2008 ; Naz *et al.*, 2010, 2011).

La reproduction

Dans cette partie nous cherchons à évaluer la toxicité du raticide utilisé dans les conditions expérimentales sur la reproduction à travers l'étude de la biologie des spermatozoïdes. Nous rappelons que le testicule exerce deux fonctions distinctes, la sécrétion des hormones androgéniques par les cellules interstitielles de Leydig d'une part, et la formation et la maturation des spermatozoïdes au niveau des tubes séminifères et l'épididyme d'autre part. Les perturbations de la fonction testiculaire peuvent toucher l'une des deux fonctions, soit les cellules de Leydig, soit les tubes séminifères ou les deux simultanément (Reznik, 2007).

La reproduction des mammifères et l'homme en particulier est une succession d'étapes fondamentales permettant d'engendrer une descendance et sauvegarder l'espèce : la production des gamètes par les deux sexes, l'accouplement, la fécondation, le développement embryonnaire et la naissance (Thibault et Levesseur, 1991). Les dangers pour la reproduction sont définis comme étant des agents chimiques, physiques, ou biologiques qui peuvent causer soit une altération de la reproduction soit des effets néfastes sur le développement. Des études de la toxicité sub-chronique d'un raticide (1080) effectuées par Wolfe (1988) et Eason et Turck (2002) chez les rats, ont rapporté que le

Le système reproducteur masculin est l'un des systèmes cibles pour ce raticide. Par conséquent, une attention particulière a été donnée au système reproducteur masculin dans notre étude. L'effet des raticides anticoagulants sur la reproduction est difficile à déterminer en raison du nombre limité de données.

Dans notre étude, l'analyse de la qualité du sperme des lapins traités par le Brodifacoum a montré une diminution significative de la vitesse, la mobilité, la concentration ainsi que la vitalité des spermatozoïdes. Ces variations peuvent être expliquées par l'effet de Brodifacoum sur les testicules ou il a altéré la synthèse des androgènes intervenant dans le contrôle de la taille et le poids des testicules ainsi que la régulation de la fonction sécrétoire des testicules et de l'épididyme. En accord avec ces résultats, Mohammed et Kadhim (2006) montrent des différences significatives dans les diamètres des tubes séminifères chez les rats mâles traités par 50, 75 et 100 ppm de Brodifacoum pendant dix jours. Aussi, une diminution de l'épaisseur des parois des tubes séminifères a été observée. Les résultats de notre étude montrent une augmentation du nombre des spermatozoïdes morts et des spermatozoïdes ayant des malformations chez les lapins traités par rapport aux témoins. Ces résultats correspondent avec ceux trouvés par Mohammed et Kadhim (2006), où ils ont observé les mêmes constatations après le traitement des rats par 50, 75 et 100 ppm de Brodifacoum pendant dix jours. Les résultats obtenus du poids des gonades ont montré une toxicité reproductrice révélée par la diminution du poids absolu et relatif des testicules chez des rats traités par : 0, 0,05, 0,20 ou 0,50 mg/kg/j de (1080) pendant 13 semaines. Dans le groupe traité par la dose la plus forte, des changements au niveau des testicules y compris une hypo-spermato-génèse avec des fusions dans les tubes séminifères, et dans l'épididyme, des spermatozoïdes immatures et malformés, ainsi qu'une quantité de sperme réduite ont été démontrés (Wolfe, 1988). Une diminution significative de la quantité du sperme a été

remarquée. Aussi, la mobilité du sperme a été réduite à 0 %, et une grande augmentation du pourcentage du sperme anormal (à 99 %) a été rapportée par Eason et Turck (2002) après le traitement de 10 rats par : 0, 0,025, 0,075 et 0,25 mg/kg/j de (1080) pendant 90 jours. Shinoda *et al.* (2000) ont étudié l'effet de l'exposition des rats mâles à 0,5 ou 1,0 mg/kg de (1080) par gavage. Les testicules ont été examinés de trois rats à 3, 6, 12, 24, et 36 heures. Aucun changement morphologique ne s'est produit après l'exposition à la faible dose. Au niveau de la dose la plus élevée, ils ont trouvé que le (1080) a causé des nécroses et l'apoptose des spermatogonies. L'étude a démontré clairement un effet rapide sur les cellules germinales des testicules. Alternativement, le (1080) peut causer son effet en perturbant le fonctionnement des cellules de Sertoli qui nourrissent et maintiennent les cellules reproductrices.

Histologie

Dans notre étude l'administration du Brodifacoum aux lapins a provoqué des altérations histologiques. Chez les lapins traités, une altération notable de l'ultra-structure a été observée, ce qui pourrait être dû aux effets toxiques du Brodifacoum. De plus, les résultats de l'étude histologique confirment les observations biochimiques constatées au niveau du foie. Le Brodifacoum a causé une congestion, une dilatation du parenchyme, et une vacuolisation des hépatocytes. Des changements similaires dans le tissu hépatique chez les cailles ont été rapportés par des recherches antérieures de Hussain *et al.* (2013) après le traitement par le Malathion. Ils ont observé une vacuolisation cytoplasmique au 17^{ème} jour dans le foie (10-15% cellules) des cailles traités par les doses inférieures (50 et 75 mg/kg). Au 34^{ème} et 51^{ème} jour de l'expérience, ils ont également observé une légère infiltration cellulaire des leucocytes et la condensation nucléaire. Les changements microscopiques des

hépatocytes des cailles au Malathion administré au 17^{ème} jour (100 et 125 mg/kg) étaient une vacuolisation modérée des hépatocytes et un aspect granulaire du noyau. Cependant, au 34^{ème} et 51^{ème} jour, ils ont observé une dégénération grave dans le tissu hépatique, une congestion et des changements nucléaires (fragmentation, condensation et désintégration) dans le foie. Des observations microscopiques similaires ont été rapportées chez les rats (Mossalam *et al.*, 2011). Dans des sections de foie, Revathi et Yogananda (2006) ont également observé des vacuolisations et des nécroses chez des rats traités par la Bromadiolone. Abd El-Daly et Abd Nassar (2014) ont trouvé des changements analogues dans le tissu hépatique chez les rats après le traitement par le Difénacoum à raison de 0,25 et 0,5 mg/kg pendant deux et quatre jours.

Plusieurs études récentes prouvent l'effet néfaste d'une grande variété des familles chimiques de pesticides sur le système reproducteur, principalement les organes annexes, la structure histologiques des testicules et l'activité physiologique des cellules de Leydig et de Sertoli, affectant ainsi la fertilité (Ngoula, 2007 ; Sayim, 2007 ; Aziz *et al.*, 2008 ; Bitri *et al.*, 2008 ; Maitra et Mitra, 2008 ; Mountassif *et al.*, 2008 ; Zidan, 2009).

Les cellules de Leydig sont le principal site de la synthèse de la testostérone. Cette hormone joue un rôle essentiel dans le maintien de la spermatogénèse, les caractères sexuels males et la fertilité. En générale, les substances toxiques présentent un effet direct sur la fonction des cellules de Sertoli qui interviennent dans le contrôle de la spermatogénèse. Cependant, chaque destruction de ces cellules provoque une désorganisation et une atrophie des tubes séminifères.

Dans notre étude, les lapins traités par le Brodifacoum montrent des changements histologiques altérant essentiellement l'architecture et la fonction testiculaire caractérisés par une atrophie, qui est une pathologie qui se traduit par une taille diminuée des testicules

par rapport à la normale. L'atrophie des testicules peut réduire voire stopper leur fonctionnement normal et entraîner des troubles de la fertilité, parfois la stérilité. Cette atrophie est accompagnée d'une diminution du diamètre des tubes séminifères ; une faible densité du sperme dans la lumière qui peut être due à une réduction de la spermatogénèse ; des altérations dégénératives au niveau de l'épithélium séminale, désorganisation et destruction des cellules germinales, de Sertoli et de Leydig indispensables au bon déroulement de la spermatogénèse. Miao *et al.* (2001), Singla *et al.* (2013) et Dhar *et al.* (2014) ont rapporté des dommages dans le tissu testiculaire sous forme de quantité diminuée des spermatogonies dans les testicules des rats traités par le Triptolide (un raticide) suggérant l'effet du Triptolide sur la spermatogénèse. Hikim *et al.* (2000) ont rapporté peu ou pas d'effet du Triptolide (100 µg/kg pendant 70 jours) sur la fonction de spermatogénèse et de cellules de Leydig. Cependant, une plus longue durée de traitement par le Triptolide chez les rats mâles (100 µg/kg pendant 82 jours), a affecté la spermatogénèse avec une variabilité marquée de la réponse chez les différents animaux (Huynh *et al.*, 2000). Dhar *et al.* (2014) ont observé une réduction des diamètres des tubes séminifères et le nombre des différentes spermatogonies dans le tissu testiculaire chez des rats recevant des appâts contenant 0,15, 0,20 et 0,25 % de Triptolide.

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

En conclusion, l'administration du Brodifacoum à raison de 0,01, 0,02 et 0,04 mg/kg/j par voie orale aux lapins pendant seulement 03 semaines a provoqué une perturbation métabolique révélée par l'apparition des atteintes de la fonction rénale, hématologique, le profil lipidique ainsi que la reproduction. Cette perturbation est associée à une altération tissulaire hépatique et testiculaire. Les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

L'étude physiologique montre que le poids corporel des lapins traités par le Brodifacoum a été diminué, nous constatons aussi que le poids relatifs des testicules et de l'épididyme ont diminué, ainsi du poids relatif du testicule et de l'épididyme. Cependant, une augmentation des indices hépato, cardio et spléno-somatiques a été notée chez les groupes traités par rapport au groupe témoin.

Nos résultats suggèrent que le traitement par le Brodifacoum a induit une hématotoxicité, reflétée par une diminution des : globules rouges, hémoglobine, hématocrites, plaquettes, volume globulaire moyen des hématies, teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, et une augmentation du taux des globules blancs, des lymphocytes, des monocytes et des granulocytes. Le Brodifacoum a probablement provoqué une diminution du taux de prothrombine toujours chez les groupes traités surtout le groupe traité à raison de 0,04 mg/kg/j.

Une perturbation du métabolisme biochimique a révélé par l'augmentation des taux sériques en : cholestérol, urée et créatinine. Néanmoins, une diminution des taux sériques en : glucose, triglycérides, acide urique, calcium et phosphore a été observée chez les animaux traités.

Les résultats de cette étude ont démontré aussi un effet reprotoxique de l'anticoagulant utilisé, révélé par une diminution de la vitesse, la mobilité, la concentration et vitalité des spermatozoïdes toujours chez les lapins traités comparés au groupe témoin.

Une altération structurale du tissu hépatique et testiculaire a été observée après le traitement des lapins par le Brodifacoum.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'effet toxique du Brodifacoum sur les différentes fonctions étudiées.

Perspectives

Au terme de cette recherche, nous proposons d'approfondir cette étude par confirmer ces effets par des doses moins faibles et des périodes plus prolongés.

Il serait souhaitable de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres tels que les paramètres de la fonction hépatique : dosage de l'ASAT, l'ALAT et la PAL. Il serait intéressant aussi de déterminer le mode d'action du métabolisme du produit à travers le dosage des résidus dans les organes cibles. Des études à l'échelle moléculaire sur l'histologie des organes les plus affectés (foie et testicules) ainsi que le dosage d'autres paramètres sur le plan hormonal tels que la testostérone et les hormones thyroïdiennes seraient également judicieuse.

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Abd El-Daly A, Abd Nassar S. Anticoagulant Difenacoum-induced histological and ultrastructural alterations in liver of Albino rats. *Intern J Adv Res*, 2014 ; 2(2) : 782-92.

ACTA. Association de Coordination Technique Agricole. Index phytosanitaire. 33^{ème} Edition, ACTA, Paris. 1997.

ACTA. Association de Coordination Technique Agricole. Index phytosanitaire. 43^{ème} Edition, ACTA, Paris. 2007.

Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral Anticoagulant Therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, 2012 ; 141(2 suppl) : e44S-e88S.

Altay S, Cakmak HA, Boz GC, Koca S, Velibey Y. Prolonged coagulopathy related to coumarin rodenticide in a young patient: superwarfarin poisoning. *Cardiovasc J Afr*, 2012 ; 23(9) : e9-e11.

Aziz N, Shah SW, Aziz RN. Histological Changes in Male Rat Reproductive Organs Post Treated With Insecticide Carbofuran (Furadan). *Annals of Microscopy*, 2008 ; 8 : 83-9.

B

Bachmann KA, Sullivan TJ. Dispositional and pharmacodynamic characteristics of brodifacoum in warfarin-sensitive rats. *Pharmacology*, 1983 ; 27(5) : 281-8.

- Bajomi D, Kis-Varga A.** A new, modern anticoagulant rodenticide, Lanirat-B. *Parasitol Hung*, 1990 ; 23 : 129-45.
- Beal MW, Doherty AM, Curcio K.** Peliosis hepatis and hemoperitoneum in a dog with diphacinone intoxication. *J Vet Emerg Crit Care*, 2008 ; (4)18 : 388-92.
- Beasley VR, Dorman DC, Fikes JD, Diana SG, Woshner V.** Anticoagulant rodenticides. In: A systems affected approach to veterinary toxicology. University of Illinois Press, Urbana, Illinois, 1997 : 910-8.
- Berny P, 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.
- Berny P.** Les raticides anticoagulants. Cours de pharmacologie-toxicologie de 3ème année, E.N.V.L, Lyon, 2006.
- Berny P, Lasseur R.** Les DL₅₀ en toxicologie. *Nuisibles Parasites Inf*, 2006, 46 : 23-5.
- Berny P, Gallet JR.** Acute poisoning of Red Kites (*Milvus milvus*) in France: Data from the SAGIR network. *J Wildl Dis*, 2008 ; 44 : 417-26.
- Berry RG, Morrison JA, Watts JW, Anagnost JW, Gonzalez JJ.** Surreptitious superwarfarin ingestion with brodifacoum. *South Med J*, 2000 ; 93 : 74-5.
- Berten D.** Intoxication de bovins par les anticoagulants. Un cas suspect sur une vache adulte. *Sem vét*, 1995 ; 794 : 36.
- Binev R, Petkov P, Rusenov A.** Intoxication with anticoagulant rodenticide bromadiolone in a dog – a case report. *Vet Arhiv*, 2005 ; 75 : 273-82.
- Bitri L, Darragi W, Ouertani L, Maurel D, Ben Saad M.** Effet de l'hexachlorobenzène sur certains paramètres de la fonction de reproduction mâle chez *Meriones unguiculatus*. Comptes Rendus Biologies, 2008 ; 331 : 380-8.

- Blocker TL, Roberts BK.** Acute tracheal obstruction associated with anticoagulant rodenticide intoxication in a dog. *J Small Anim Pract*, 1999 ; 40 : 577-80.
- Boermans HJ, Johnstone I, Black WD, Murphy M.** Clinical signs, laboratory changes and toxicokinetics of brodifacoum in the horse. *Can J Vet Res*, 1991 ; 55 : 21-7.
- Boschetti E, Molho D, Chabert J, Grand M, Fontaine L.** Nouvelles coumarines à activité anticoagulante. *Chimica Therapeutica*, 1972 ; 1 : 20-3.
- Boussarie D.** N.A.C. les zoonoses infectieuses transmises par les rongeurs et les lagomorphes. *Nouv Prat vét canine féline*, 2005 ; 22 : 73-4.
- Boyle C.** Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature*, 1960 ; 188 : 517-25.
- Bratt H.** Difenacoum. Elimination from tissues of rats following administration of a single oral dose. Imperial Chemical Industries, Central Toxicology Laboratory (Report No. CTL/P/1592), Macclesfield, Surrey, 1987.
- Breckenridge AM., Cholerton S, Hart JAD, Park BK, Scott AK.** A study of the relationship between the pharmacokinetics and pharmacodynamics of 4-hydroxycoumarin anticoagulants, warfarin, difenacoum, and brodifacoum in the rabbit. *British J Pharmacol*, 1985 ; 84 : 81-91.
- Bridier E, Aure F, Mottier F, Nivet A, Lai-Man G, Boyer N.** Les rongeurs à la Réunion, sources de nombreux fléau. *Phytoma Déf Vég*, 2006 ; 595 : 9-12.
- Brown KP, Alterio N, Moller H.** Secondary poisoning of stoats (*Mustela ermine*) at low mouse (*Mus musculus*) abundance in a New Zealand Nothofagus forest. *Wildlife Res*, 1998 ; 25 : 419-26.

Buckle AP, Fenn MGP. Rodent control in conservation of endangered species. In : Borecco JE, Marsh RE. Eds: Proceedings of the thirteenth Vertebrate Pest Conference. California, Newport Beach, 1992 : 36-41

Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem*, 1973 ; 19(5) : 476-82.

Bullard RW, Thompson RD, Holgvin G. Diphenadione (diphacinone) residue in tissue of cattle. *J Agric Food Chem*, 1976 ; 24 : 261-3.

Buronfosse F. Les intoxications des carnivores domestiques par les rodenticides AC. Circonstances d'intoxications et problèmes d'efficacité du traitement. C.N.V.S.P.A. section Ouest, Belle-Ile, (7-8-9-10 juin 1995), 1995 : 312-26.

C

Cloet-Chabre B. L'hémostase et la fibrinolyse : les affections de la coagulation plasmatique et de la Fibrinolyse. *Prat méd chir Anim Cie*, 1998 ; 33(5) : 363-74.

Colvin BA, Jackson WB, Hegdal PL. Secondary poisoning hazards associated with rodenticide use. In: Proceedings of 11th International Congress on Plant Protection. Magallona, 1991.

Crowther MA, Julian J, McCarty D, Douketis J, Kovacs M, Biagoni L, Schnurr T, McGinnis J, Gent M, Hirsh J, Ginsberg J. Treatment of warfarin-associated coagulopathy with oral vitamin K: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2000 ; 35(6) : 1551-3.

D

- Dagnac L.** Les maladies parasitaires et mycosiques transmises à l'homme par les animaux d'espèces inhabituelles (AEI). Thèse de Doctorat Vétérinaire, Nantes, 2004 : 222.
- Davidson RS , Armstrong DP.** Estimating impacts of poison operations on non-target species using mark-recapture analysis and simulation modelling: an example with saddlebacks. *Biol Conserv*, 2002 ; 105(3) : 375–81.
- Deepa S, Mishra AK.** Fluorescence spectroscopic study of serum albuminbromadiolone interaction: fluorimetric determination of bromadiolone. *J Pharm Biomed Anal*, 2005 ; 38 : 556–63.
- Delley B, Joseph E.** Prévention des pullulations de campagnols terrestres en prairie de montagne - acquis récents et perspectives de développement d'appâts rodenticides. *Rech Agronom Suisse*, 1985 ; 24 : 121–78.
- Dhar P, Singla N, Babbar BK.** Effect of Triptolide on Vital Organs, Blood Biochemical Parameters and Histomorphology of Testis in Male *Bandicota Bengalensis*. *Indian J Appl Res*, 2014 : 4(2) : 27–30.
- Dorman DC, Simon J, Harlin KA, Buck WB.** Diagnosis of bromethalin toxicosis in the dog. *J Vet Diagn Invest*, 1990 ; 2 : 123–28.
- Dorman DC, Zachary JF, Buck WB.** Neuropathologic findings of bromethalin toxicosis in the cat. *Vet Pathol*, 1992 ; 29 : 139–44.
- Dowding JE, Murphy EC, Veitch CR.** Brodifacoum residues in target and non-target species following an aerial poisoning operation on Motuihe Island, Hauraki Gulf, New Zealand. *New Zealand J Ecol*, 1999 ; 23 : 207–14.

Dowding CV, Shore RF, Worgan A, Baker PJ, Harris S. Accumulation of anticoagulant rodenticides in a non-target insectivore, the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Environ Pollut*, 2010 ; 158(1) : 161–6.

DuVall MD, Murphy MJ, Ray AC, Reagor JC. Case studies on second-generation anticoagulant rodenticide toxicities in nontarget species. *J Vet Diagn Invest*, 1989 ; 1 : 66–8.

F

Eason CT, Jolly SE. Anticoagulant effects of pindone in the rabbit and Australian brushtail possum. *Wildlife Res*, 1993 ; 20 : 371–4.

Eason CT, Frampton CM, Henderson R, Thomas MD, Morgan DR. Sodium monofluoroacetate and alternative toxins for possum control. *New Zealand J Zool*, 1993 ; 20 : 329–34.

Eason CT, Henderson R, Thomas MD, Frampton CM. The advantages and disadvantages of sodium monofluoroacetate and alternative toxins for possum control. In: Seawright AA, Eason CT. Eds. Proceedings of the science workshop on 1080. The Royal Society of New Zealand Miscellaneous Series, Wellington, 1994.

Eason CT, Spurr EB. Review of the toxicity and impacts of brodifacoum on non-target wildlife in New Zealand. *New Zealand J Zool*, 1995 ; 22 : 371–9.

Eason CT, Wright GR, Meikle L. The persistence and secondary poisoning risks of sodium monofluoroacetate (1080), brodifacoum and cholecalciferol in possums. In: Timm RM, Crabb AC. Eds. Proceedings of the Seventeenth Vertebrate Pest Conference. California, Davis, 1996a.

Eason CT, Wright GR, Batcheler D. Anticoagulant effects and the persistence of brodifacoum in possums (*Trichosurus vulpecula*). *New Zealand J of Agric Res*, 1996b ; 39 : 397–400.

- Eason CT, Wickstrom M, Turck P, Wright GRG.** A review of recent regulatory and environmental toxicology studies on 1080: results and implications. *New Zealand J Ecol*, 1999a ; 23 : 129-37.
- Eason CT, Milne L, Potts M, Morriss G, Wright GRG, Sutherland ORW.** Secondary and tertiary poisoning risks associated with brodifacoum. *New Zealand J Ecol*, 1999b ; 23 : 219-24.
- Eason CT, Murphy E, Wright G, O'Connor C, Buckle A.** Risk assessment of broad-scale toxicant application for rodent eradication on island versus mainland use. In: Proceedings 2nd European Vertebrate Pest Management Conference, Braunschweig, Germany, 2000a.
- Eason CT, Wickstrom M, Henderson R, Milne L, Arthur D.** Non-target and secondary poisoning risks associated with Cholecalciferol. *New Zealand Plant Prot*, 2000b ; 53 : 299-304.
- Eason CT, Wickstrom M.** Vertebrate Pesticide Toxicology Manual (poisons): Information on Poisons Used in New Zealand as Vertebrate Pesticides. *Rev ed Wellington*, 2001 ; 23 : 41-55.
- Eason CT, Turck P.** A 90-day toxicological evaluation of Compound 1080 (sodium monofluoroacetate) in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 2002 ; 69(2) : 439-47.
- Eason CT, Murphy EC, Wright GR, Spurr EB.** Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicol*, 2002 ; 11 : 35-48.
- Elias DJ, Thompson RD, Savarie PJ.** Effects of the anticoagulant diphenadione on suckling calves. *Bull environ Contam Toxicol*, 1978 ; 20 : 71-8.
- Endepols S, Kleemann N, Pelz HJ, Ziebell KL.** A scheme for the placement of rodenticide baits for rat eradication on confinement livestock farms. *Prev Vet Med*, 2003 ; 58 : 115-23.
- EPPO (European Plant Protection Organization).** Testing rodents for resistance anticoagulant rodenticides. Bulletin, 1995 ; 198 : 575-93.

Erichsen C, Søndenaa K, Søreide JA, Andersen E, Tysvoer A, Sndenaa K, Sreide JA.
Spontaneous liver hematomas induced by anti-coagulation therapy. A case report and review of the literature. *Hepatogastroenterology*, 1993 ; 40(4) : 402-6.

Erickson W, Urban D, Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Non-target Mammals: a Comparative Approach. United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 2002 ; 1 : 1-214.

\mathcal{F}

Farell EC. Calcium. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company. 1984a ; 1051-255 et 418.

Farell EC. Phosphorus. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company. 1984b ; 1072- 4 et 418.

Felice LJ, Murphy MJ. CVT update: Anticoagulant rodenticides. In: Bonagura JD, Kirk RW. Eds. *Current veterinary therapy XII. Small animal practice*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1995.

Finco DR. Kidney functions. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruce ML. Eds. *Clinical biochemistry of domestic animal*. 5th ed. CA: Academic Press, San Diego, 1997 : 462-78.

Fitzek A. Pharmacokinetics of 2-pivaloylindane 1, 3-Dione in dogs. *Acta Pharmacol Toxicol*, 1978 ; 42 : 81-7.

Fournier-Chambrillon C, Berny PJ, Coiffier O, Barbedienne P, Dassé B, Delas G, Galineau H, Mazet A, Pouzenc P, Rosoux R, Fournier P. 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*, 2004 ; 40 : 688-95.

Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood*, 1990 ; 75(9) : 1753-62.

G

Gaillard H. Rodenticides anticoagulants : mécanisme d'action et résistance. *Thèse de doctorat vétérinaire*. Université Claude Bernard, Lyon, 1996 ; 118.

Gallen F. Approche historique des trois pandémies de peste humaine. Epidémiologie et prophylaxie sanitaire à travers les âges. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Lyon, 2000 ; 232.

Gillies CA, Pierce RJ. Secondary poisoning of mammalian predators during possum and rodent control operations at Trounson Kauri Park, Northland, New Zealand. *New Zealand J Ecol*, 1999 ; 23 : 183-92.

Giraudoux P, Tremolières C, Barbier B, Defaut R, Rieffel D, Bernard N, Lucot E, Berny P. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environ Res*, 2006 ; 102(3) : 291-8.

Godfrey MER. The toxicology of brodifacoum to target and non-target species in New Zealand. In: Proceedings of a Conference on the Organization and Practice of Vertebrate Pest Control, Elvetham Hall, Hampshire, 1984 : 631-7.

Godfrey MER. Non-target and secondary poisoning hazards of second generation anticoagulants. *Acta Zool Fennica*, 1985 ; 173 : 209-12.

Goncalves Da Cruz I. Contribution à l'étude du portage zoonotique chez des rats de terrain. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Lyon, 2007 : 92.

Goodman L, Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics. 5th Edition. New York : Macmillan Company. 1975 : 1704.

Grand M. Données expérimentales sur un nouveau raticide anticoagulant : le bromadiolone. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, 1976 ; 25 : 69-88.

Grolleau G, Lorgue G, Nahas K. Toxicité secondaire, en laboratoire, d'un rodenticide anticoagulant (bromadiolone) pour des prédateurs de rongeurs champêtres. Buse variable (*Buteo buteo*) et Hermine (*Mustela erminea*). Bulletin OEPP/EPPO. 1989 ; 19 : 633-48.

\mathcal{H}

Hadler MR. Acute oral toxicity of WBA 8119 to male rabbit. Appendix 5. Widnes, Cheshire, Ward Blenkinsop & Co. Ltd, Agricultural Research, 1975a : 3.

Hadler MR. Acute oral toxicity of WBA 8119 to female Guinea pig. Appendix 6. Widnes, Cheshire, Ward Blenkinsop & Co. Ltd, Agricultural Research, 1975b : 4.

Hadler MR, Shadbolt RS. Novel 4-hydroxycoumarin anticoagulants active against resistant rats. *Nat*, 1975 ; 253 : 277-82.

Hadler MR. WBA 8119-12 week feeding study in rats. Widnes, Cheshire, Ward Blenkinsop & Co. Ltd, Agricultural Research, 1976 : 7.

Hansen N, Beck C. Bilateral hydronephrosis secondary to anticoagulant rodenticide intoxication in a dog. *J Vet Emerg Crit Care*, 2003 ; 13 : 103-7.

Haug B, Schjødt-Iversen L, Rygh J. Poisoning with long-acting anticoagulants *Tidsskr Nor Laegeforen*, 1992 ; 112 : 1958-60.

- Hikim AP, Lue YH, Wang C, Reutrakul V, Sangsuwan R, Swerdloff RS.** Post-testicular antifertility action of triptolide in the male rat: evidence for severe impairment of cauda epididymal sperm ultrastructure. *J Androl*, 2000 ; 21(3) : 431-7.
- Hone J, Mulligan H.** Vertebrate pesticides. Science Bulletin 89. Department of Agriculture, New South Wales, 1982.
- Hoogenboom JJL.** Anticoagulant poisoning cases 1977-1994 .New Zealand Central Animal Health Laboratory Wellington, New Zealand, 1994.
- Huckle KR, Hutson DH, Warburton PA.** Elimination and accumulation of the rodenticide flocoumafen in rats following repeated oral administration. *Xenobiotica*, 1988 ; 18 : 1465-79.
- Huckle KR, Warburton PA.** Studies on the fate of flocoumafen in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Xenobiotica*, 1989 ; 19 : 51-62.
- 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.
- Huguet X.** Intoxication par la bromadiolone. Etude épidémiologique et clinique d'après les données du C.N.I.T.V. Lyon et du laboratoire de toxicologie de l'E.N.V.L de 1991 à 1996. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Lyon, 1998 : 111.
- Hussain R, Khan A, Mahmood F.** Pathological and some serum biochemical effects induced by malathion in japanese quail (*coturnix japonica*). *J Anim Plant Sci*, 2013 ; 23(6) : 1501-6.
- Huynh PN, Hikim AP, Wang C, Stefonovic K, Lue YH, Leung A, Atienza V, Baravarian S, Reutrakul V, Swerdloff RS.** Long-term effects of triptolide on spermatogenesis, epididymal sperm function and fertility in male rats. *J Androl*, 2000 ; 21: 689-99.

J

Jain NC, Essentials of veterinary hematology. 1st edition. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 1993 : 417.

James SB, Raphael BL, Cook RA. Brodifacoum toxicity and treatment in a white-winged wood duck (*Cairina scutulata*). *J Zool Wildl Med*, 1998 ; 29 : 324-7.

Jeannin P. Luttes chimiques contre les rongeurs sauvages. Appréciation des risques d'utilisation dans le milieu naturel d'anticoagulants rodenticides. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Lyon, 1983 : 132.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, 1984 ; 70(1) : 219-28.

K

Kamil N. Kinetics of bromodialone, anticoagulant rodenticide, in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Pharmacol Res Commun*, 1987 ; 19(11) : 767-75.

Kaplan LA. Glucose. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company. 1984a ; 1032-1036.

Kaplan LA. Urea. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company ; 1984b : 1257-60.

Kelly JG, O'Malley K. Clinical pharmacokinetics of oral anticoagulant. *Clin Pharmacokinetics*, 1979 ; 4 : 1-15.

Kemikalieinspektionen SCI. Competent authority report according to directive 98/8/EC
Bromadiolone Cas 28772-56-7; Sweden. 2006.

Kohn B, Weingart C, Giger U. Haemorrhage in seven cats with suspected anticoagulant rodenticide intoxication. *J Feline Med Surg*. 2003 ; 5 : 295-304.

Kohtrula H, Nakamura G, Zumiyama MA. Biochemical basis of carbon tetrachloride induced toxicity. *J Lab Toxicol*. 1989 ; 13 : 35-45.

Kolf-Clauw M, Alvarez E, Matray O. Anticoagulant rodenticides : étiologie, diagnostic et traitement des intoxications. In: Recueil de Médecine Vétérinaire. Spécial toxicologie des carnivores domestiques. Pari : Vigot Éditions ; 1995 : 127-34.

L

Laas FJ, Forss DA, Godfrey MER. Retention of brodifacoum in sheep tissues and excretion in faeces. *New Zealand J Agric Res*. 1985 ; 28 : 357-9.

Lambert O, Pouliquen H, Larhantec M, Thorin C, L'Hostis M. Exposure of raptors and waterbirds to anticoagulant rodenticides (Difenacoum, bromadiolone, coumatetralyl, coumafén, brodifacoum). Epidemiological survey in loire atlantique (France). *Bull Environ Contam Toxicol*. 2007 ; 79 : 91-4.

Lasseur R. Résistance aux raticides anticoagulants : implication du gène VKORC₁ et répertorisation des lignées résistantes en France. *Thèse de doctorat de toxicologie*, Lyon, 2006 : 201.

Le Bonniec B. La cible de la warfarine identifiée. *M/S : Médecine Science*, 2004 ; 20 : 512-4.

Le Louarn H, Quere JP. Les Rongeurs de France : Faunistique et Biologie. 2^{ème} édition. Paris. INRA, 2003.

- Lechevin JC, Poche RM.** Activity of LM2219 (Difethialone), a new anticoagulant rodenticide, in commensal rodents. In: Crabb AC, Marsh RE. Eds. Proceedings of the Vertebrate Pest Conference. California, Davis, 1988.
- Leman E.** Les rongeurs de France: biologie, problèmes matériels et sanitaires, lutte. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Paris, 1983 : 264.
- Lewis JH.** Comparative hemostasis in vertebrates. 1st edition. New York: Plenum press, 1996.
- Lewis DC, Bruyette DS, Kellerman DL, Smith SA.** Thrombocytopenia in dogs with anticoagulant rodenticide-induced hemorrhage: eight cases (1990-1995). *J Am Anim Hosp Assoc*, 1997 ; 33 : 417-22.
- Lin PJ, Jin DY, Tie JK, Presnell SR, Straight DL, Stafford DW.** The Putative Vitamin K-dependent gamma -Glutamyl Carboxylase Internal Propeptide Appears to Be the Propeptide Binding Site. *J Biol Chem*, 2002 ; 277 : 28584-91.
- Linder M.** Genetic mechanisms for hypersensitivity and resistance to the anticoagulant warfarin. *Clinica Chimica Acta*, 2001 ; 308 : 1-2, 9-15.
- Lipha.** The metabolism of ¹⁴C-LM 637 in the rat and its binding to rat plasma proteins. Non-public. Laboratory report no. LPA 41/81587 GLP/Unpublished. 1982.
- Lipha.** Kinetics of Bromadiolone, anticoagulant rodenticide, in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). ENVL-INRA, France. The Italian Pharmacological Societ, Pharmacological research Communications Vol 19 No. 11, 767-775. Non GLP/Published. 1987.
- Lipton RA, Klass EM.** Human ingestion of a "superwarfarin" rodenticide resulting in a prolonged anticoagulant effect. *JAMA*, 1984 ; 252 : 3004-5.
- Litovitz TL, Klein-Schwartz W, Dyer KS, Shannon M, Lee S, Powers M.** 1997 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am J Emerg Med*, 1998 ; 16 : 443-97.

- Littin KE, O'Connor CE, Eason CT.** Comparative effects of brodifacoum on rats and possum. *New Zealand Plant Prot*, 2000 ; 53 : 310-5.
- Littin KE, O'Connor CE, Gregory NG, Mellor DJ, Eason CT.** Behaviour, coagulopathy and pathology of brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) poisoned with brodifacoum. *Wildlife Res*, 2002 ; 29(3) : 259-67.
- Lodal J, Hansen OC.** Human and environmental exposure scenarios for rodenticides – Focus on the Nordic countries. Copenhagen : Nordic Council of Ministers, 2002.
- Loyau M.** Toxicologie des rodenticides anticoagulants chez les volailles. Etude bibliographique et essai expérimental : détermination de la teneur en coumafène de l'œuf après administration unique chez la poule. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Nantes, 1996 : 71.
- Lutze G, Römhild W, Elwert J, Leppelt J, Kutschmann K.** Case report. Phenprocoumon (Marcumar, Falithrom) as an unusual reason for coumarin poisoning in a dog. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 2003 ; 110 : 31-3.

M

- Maitra SK, Mitra A.** Testicular functions and serum titers of LH and testosterone in methyl parathion-fed roseringed parakeets. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008 ; 71(1) : 236-44.
- Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A.** Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicol*, 2000 ; 143 : 1-118.
- Maros A.** Les zoonoses transmises par les nouveaux animaux de compagnie (rongeurs et lagomorphes, furets, reptiles). *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Nantes, 2000 : 200.
- Marsh RE.** Bromadiolone, a new anticoagulant rodenticide. *EPPO Bulletin*, 1977 ; 7 (2) : 495-502.

Les effets des nouveaux raticides sur quelques paramètres physiologiques chez les animaux de laboratoire

- Martin GR, Sutherland RJ, Robertson ID, Kirkpatrick WE, King DR, Hood PJ.** Assessment of the potential toxicity of a poison for rabbits, pindone (2-pivalyl 1, 3 indandione), to domestic animals. *Aust Vet J*, 1991 ; 68(7) : 241-3.
- Martoja R, Martoja PM.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris : Edition Masson, 1967 : 345.
- Mason G, Littin KE.** The humaneness of rodent pest control. *Animal Welfare*, 2003 ; 12 : 1-37.
- Mathet T.** Les rodenticides anticoagulants : mécanisme d'action et antidotes. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Lyon, 1996 : 113.
- McDonald RA, Harris S, Turnbull G, Brown P, Fletcher M.** Anticoagulant rodenticides in stoats (*Mustela erminea*) and weasels (*Mustela nivalis*) in England. *Environ Pollut*, 1998 ; 103 : 17-23.
- McConnico RS, Copedge K, Bischoff KL.** Brodifacoum toxicosis in two horses. *J Am Vet Med Assoc*, 1997 ; 211 : 882-6.
- Meenken D, Wright K, Couchman A.** Brodifacoum residues in possums (*Trichosurus vulpecula*) after baiting with brodifacoum cereal bait. *New Zealand J Ecol*, 1999 ; 23 : 215-7.
- Mendenhall VM, Pank LF.** Secondary poisoning of owls by anticoagulant rodenticides. *Wildlife Soc Bull*, 1980 ; 8(4) : 311-5.
- Merton D.** Eradication of rabbits from Round Island, Mauritius: a conservation success story. *J Jersey Wildlife Pres Trust*, 1987 ; 24 : 19-43.
- Miao QL, Fu PW, Mei CY, Zhen LJ.** Antifertility effects of glycosides of *Tripterygium wilfordii* on male farmland rats and mice. *J Agric Sci*, 2001 ; 16 : 1-4.

- Miollan JM, Gourreau JM.** Toxicologie. Intoxication d'un jeune bovin par des anticoagulants. *Sem vét*, 1995 ; 786 : 34.
- Mohammed NG, Kadhim AHH.** The effect of brodifacoum on the reproduction of male wild house mouse *Mus musculus* (Muridae: Rodentia). *Ibn Al-Haitham J Pure Appl Sci*, 2006 ; 19(4) : 1-9.
- Moreau C, Loriot MA, Siguret V.** Vitamin K antagonists: from discovery to pharmacogenetics. *Ann Biol Clin*, 2012 ; 70(5) : 539-51.
- Morgan DR, Wright GR, Ogilvie SC, Pierce R, Thomson P.** Assessment of the environmental impact of brodifacoum during rodent eradication operations in New Zealand. In: Timm, RM, Crabb AC. Eds. Proceedings of the seventeenth. Vertebrate Pest Control Conference, California, Davis, 1996.
- Morrissey B, Burgess JL, Robertson WO.** Washington's experience and recommendations Re: anticoagulant rodenticides. *Vet Hum Toxicol*, 1995 ; 37 : 362-363.
- Mossalam HH, Abd-El Aty OA, Morgan EN, Youssaf SMS, Mackawy AMH.** Biochemical and ultra-structure studies of the antioxidant effect of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* on the nephrotoxicity induced by organophosphorous pesticide (malathion) on the adult albino rats. *Life Sci J*, 2011 ; 8 : 561-74.
- Mosterd JJ, Thijssen HH.** The long-term effects of the rodenticide, brodifacoum, on blood coagulation and vitamin K metabolism in rats. *Br J Pharmacol*, 1991 ; 104(2) : 531-5.
- Mountassif D, KabineM, Mounchid K, Mounaji K, Latruffe N, El Kebaj MS.** Biochemical and histological alterations of cellular metabolism from jerboa (*Jaculus orientalis*) by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Effects on d-3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Pestic Biochem Physiol*, 2008 ; 90 : 87-96.

Munday JS, Thompson IJ. Brodifacoum toxicosis in two neonatal puppies. *Vet Pathol*, 2003 ; 40 : 216-9.

Murphy MJ, Gerken DF. The anticoagulant rodenticides. In: Kirk RW. Eds. *Current veterinary therapy X. Small animal practice*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1989.

Murphy EC, Clapperton BK, Bradfield PMF, Speed HJ. Brodifacoum residues in target and non-target animals following large-scale poison operations in New Zealand podocarp hardwood forests. *New Zealand J Zool*, 1998 ; 25 : 307-14.

Murphy MJ. CVT update: Rodenticide toxicosis. In: Bonagura JD. Eds. *Current veterinary therapy XIII. Small animal practice*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1999.

Murphy EC, Robbins L, Young JB, Dowding JE. Secondary poisoning of stoats after an aerial 1080 poison operation in Pureora Forest, New Zealand. *New Zealand J Ecol*, 1999 ; 23 : 175-82.

Murphy MJ. Rodenticides. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2002 ; 32 : 469-84.

Murray RL. Creatinine. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company ; 1984 ; 1261-6.

N

Nahas K. Etude d'une population de *Rattus norvegicus* résistante au coumafène raticide anticoagulant. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Lyon, 1984 : 99.

Naito HK. Cholesterol. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company ; 1984 ; 1194-11206 .

- Naz S, Rana SA, Javed M, Rehman KU.** Effect of Two Different Rodenticides on Serum Biochemistry of House Rats (*Rattus rattus*). *Pak Vet J*. 2010 ; 30(4) : 239-41.
- Naz S, Rana SA, Javed M, Rehman KU.** Toxicological effects of brodifacoum and food energy inhibitor on some physiological parameters in house rats (*Rattus rattus*). *Pak Vet J*. 2011 ; 31(3) : 219-22.
- Nelson PC, Hickling GJ.** Pindone for rabbit control : efficacy, residue, and costs. In: Halverson WS, Crabb AC. Eds. Proceedings of the sixteenth Vertebrate Pest Conference. California, Davis, 1994.
- Neofotistos D, Oropeza M, Ts'ao CH.** Stability of plasma for add-on PT and APTT tests. *Am J Clin Pathol*. 1998 ; 109(6) : 758-63.
- Newton I, Wyllie I, Freestone P.** Rodenticides in British barn owls. *Environ Pollut*. 1990 ; 68 : 101-17.
- Ngoula F, Watcho P, Dongmo MC, Kenfack A, Kamtchouing P, Tchoumboué J.** Effects of pirimiphos-methyl (an organophosphate insecticide) on the fertility of adult male rats. *Afr Health Sci*. 2007 ; 7(1) : 3-9.

O

O'Brien PH, Beck JA, Lukins BS. Residue tissue levels of warfarin and 1080 in poisoned feral pigs. Working paper presented at the Australian Vertebrate Pest Control Conference. (unpublished report). 1987.

O'Connor J. The use of blood anticoagulants for rodent control. *Res*. 1948 ; 1 : 334-6.

O'Neil MJ. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition, New Jersey: Merck and Co., Inc ; 2001.

- O'Reilly RA, Aggeler PM, Leong LS.** Studies on the coumarin anticoagulant drugs: The pharmacodynamics of warfarin in man. *J Clin Invest*, 1963 ; 4 : 5142-1551.
- Oliver AJ, Wheeler SH.** The toxicity of the anticoagulant pindone to the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, and the sheep, *Ovis aries*. *Aust Wildl Res*, 1978 ; 5 : 135-42.
- Olkowski A, Gooneratne R, Eason CT.** Cytochrome P450 enzyme activity in the Australian brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*: A comparison with rat, rabbit, sheep, and chicken. *Vet Hum Toxicol*, 1998 ; 40(2) : 70-6.
- OMS.** Manuel de laboratoire de l'OMS analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec les mucus cervical INSERM, 1993.
- OMS.** Anticoagulant Rodenticides - Environmental Health Criteria 175. Geneva, International Programme on Chemical Safety, 1995 : 97.
- OMS.** Instructions for determining the susceptibility or resistance of rodents to anticoagulants rodenticids. *Vector Biol Control Ser*, 1982 ; 82 : 843-9.
- Osweiler GD.** Rodenticides. In: Toxicology, The National Veterinary Medical Series. Williams and Wilkins. Baltimore, 1996.

P

- Pachtinger GE, Otto CM, Syring RS.** Incidence of prolonged prothrombin time in dogs following gastrointestinal decontamination for acute anticoagulant rodenticide ingestion. *J Vet Emerg Crit Care*, 2008 ; 18(3) : 285-91.
- Pain DJ, Carter I, Sainsbury AW, Shore RF, Eden P, Taggart MA, Konstantinos S, Walker LA, Meharg AA, Raab A.** Lead contamination and associated disease in captive and reintroduced red kites *Milvus milvus* in England. *Sci Total Environ*, 2007 ; 376(1-3) : 116-27.

- Park BK, Choonara IA, Haynes BP, Breckenbridge AM, Malia RG, Preston FE.** Abnormal vitamin K metabolism in the presence of normal clotting factor activity in factory workers exposed to 4-hydroxycoumarins. *British J Clin Pharmacol*, 1986 ; 21 : 289-94.
- Parkinson GR.** WBA 8119. Acute oral toxicity. Macclesfield, Cheshire, Imperial Chemical Industries Ltd, Central Toxicology Laboratory (Report No. CTL/P/216 (revised)). 1975.
- Parkinson GR.** PP581. Acute oral toxicity to sheep. Macclesfield, Cheshire, Imperial Chemical Industries Ltd, Central Toxicology Laboratory (Report No. CTL/P/259 (revised)). 1976.
- Parmar G, Bratt H, Moore R, Batten PL.** Evidence for a common binding site *in vivo* for the retention of anticoagulants in rat liver. *Hum Toxicol*, 1987 ; 6 : 431-432.
- Pejcoch MK, Kriz B.** Ecology, epidemiology and prevention of Hantavirus in Europe. In: Menne B, Ebi K. Eds. Climate change and adaptation: strategies for human health. Steinkopff Darmstadt, 2006 : 243-57.
- Pelfrene AF.** Synthetic organic rodenticides. In: Hanbook of pesticides toxicology, Class of pesticides, Hayes WJ Jr, Laws ER Jr. Eds. Academic press, Inc. San Diego, 1991 : 1271-316.
- Peterson J, Streeter V.** Laryngeal obstruction secondary to brodifacoum toxicosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 1996 ; 208 : 352-4.
- Petrus DJ, Henik RA.** Pericardial effusion and cardiac tamponade secondary to brodifacoum toxicosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 1999 ; 215 : 647-8.
- Petterino C, Biancardi P.** Toxicology of various AC rodenticides in animals. *Vet Hum Toxicol*, 2001 ; 43 : 353-60.
- Petterino C, Paolo B, Tristo G.** Clinical and pathological features of anticoagulant rodenticide intoxications in dogs. *Vet Hum Toxicol*, 2004 ; 46 : 70-5.
- Poché RM.** The status of bromadiolone in the United States. In: Salmon TP. Eds. Proceedings

Twelfth Vertebrate Pest Conference. California, Davis, 1986.

Pouliquen H. Intoxication par un rodenticide anticoagulant. *Point vét.* 2001 ; 32(221) : 36-9.

Presnell SR, Stafford DW. The vitamin K-dependant carboxylase. *Thromb haemost.* 2002 ; 87(6) : 937-46.

Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 ; 20 : 317-27.

Pyrola K. Sex differences in the clotting factor response to warfarin and of warfarin metabolism in the rat. *Annales Medicinal Experimentalis et Biologiae Fenniae.* 1968 ; 46 : 23-34.

R

Rao JV. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pestic Biochem Physiol.* 2006 ; 86 : 78-84.

Riba G, Silvy C. Combattre les ravageurs des cultures, enjeux et perspectives. Paris. INRA, 1989 : 230.

Riley SPD, Bromley C, Poppenga RH, Uzal FA, Whited L, Sauvajot R. Anticoagulant Exposure and Notoedric Mange in Bobcats and Mountain Lions in Urban Southern California. *J Wildlife Manag.* 2007 ; 71 : 1874-84.

Redfern R, Gill JE, Hadler MR. Laboratory evaluation of WBA 8119 as a rodenticide for use against warfarin-resistant and non-resistant rats and mice. *J Hyg.* 1976 ; 77: 419-26.

- Rennison BD, Hadler MR.** Field trials of difenacoum against warfarin-resistant infestations of *Rattus norvegicus*. *J Hyg*, 1975 ; 74 : 449-55.
- Revathi K, Yogananda M.** Effect of bromadiolone on haematology, liver and kidney in *Mus musculus*. *J Environ Biol*, 2006 ; 27(1) : 135-40.
- Reznik Y.** Évaluation hormonale de la fonction testiculaire chez l'adulte jeune. *Méd Ther : Méd Reprod*, 2007 ; 9(5) : 284-92.
- Robben JH, Mout HC, Kuijpers EA.** Anticoagulant rodenticide poisoning in dogs in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneesk*, 1997 ; 122 : 466-71.
- Robben JH, Kuijpers EA, Mout HC.** Plasma superwarfarin levels and vitamin K₁ treatment in dogs with anticoagulant rodenticide poisoning. *Vet Q*, 1998 ; 20 : 24-7.
- Robertson HA, Colbourne RM, Nieuwland F.** Survival of little spotted kiwi and other forest birds exposed to brodifacoum rat poison on Red Mercury Island. *Notornis*, 1993 ; 40 : 253-62.
- Robertson HA, Colbourne RM, Graham PJ, Miller PJ, Pierce RJ.** Survival of brown kiwi (*Apteryx mantelli*) exposed to brodifacoum poison in Northland, New Zealand. *New Zealand J Ecol*, 1999 ; 23 : 225-31.
- Robinson MH, Twigg LE, Wheeler SH, Martin GR.** Effect of the anticoagulant, pindone, on the breeding performance and survival of merino sheep, *Ovis aries*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 140(3), 2005, 465-73.
- Roch M.** Intoxications par les rodenticides anticoagulants chez les animaux : Synthèse bibliographique et réalisation d'un guide vétérinaire sur la prise en charge des animaux intoxiqués par les anticoagulants, à l'usage des professions médicales. *Thèse de doctorat*, Lyon, 2008.

Rochette P. Les intoxications animales par les rodenticides anticoagulants. Etudes épidémiologique et clinique. Bilan du Centre national d'informations toxicologiques vétérinaires de 1980 à 1983. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Lyon, 1985 : 107.

Rodrigues JP. Intoxication des carnivores domestiques par les rodenticides anticoagulants. Etude épidémiologique d'après les données du C.N.I.T.V. de 1993 à 2004 et influence de la résistance des rats aux anticoagulants. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Université Claude Bernard, Lyon, 2006 : 116.

Rossi S. Contribution à l'étude de la toxicité des anticoagulants rodenticides chez les ruminants. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Lyon, 2004 : 92.

S

Sachot E. Intoxication de canards par les anticoagulants. *Action vét*, 2000 ; 1532 : 13-5.

SAGIR, Traitement de campagnols aux anticoagulants. Evaluation de la mortalité de la faune non cible dans le Doubs. Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage. Doubs, France. 1990-2007.

Saravanan K, Kanakasabai R. Evaluation of secondary poisoning of difethialone, a new second-generation anticoagulant rodenticide to barn owl, *Tyto alba* Hartert under captivity. *Indian J Exp Biol*, 2004 ; 42 : 1013-6.

Sayim F. Histopathological effects of dimethoate on testes of rats. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2007 ; 78(6) :479-84.

Sheafor SE, Couto CG. Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 1999 ; 35 : 38-46.

- Shearer MJ.** Vitamin K and vitamin K-dependant proteins. *British J of haematol*, 1990 ; 75 : 156-62.
- Sherley M.** The traditional categories of fluoroacetate poisoning signs and symptoms belie substantial underlying similarities. *Toxicol Lett*, 2004 ; 151 : 399-406.
- Shinoda K, Mitsumori K, Uneyama C, Uehara M.** Induction and inhibition of testicular germ cell apoptosis by fluoroacetate in rats. *Arch Toxicol*, 2000 ; 74(1) : 33-9.
- Shirer M.** In poisons defence. *Terra Nova*, 1992 ; 17: 3.
- Shore RF, Birks JDS, Freestone P.** Exposure of non-target vertebrates to second-generation rodenticides in Britain, with particular reference to the polecat *Mustela putorius*. *New Zealand J Ecol*, 1999 ; 23 : 199-206.
- Shore RF, Rattner BA.** Ecotoxicology of wild mammals. Ecological & Environmental Toxicology Series. Chichester: Wiley & Sons, Ltd., 2001.
- Shore RF, Birks JDS, Freestone P, Kitchener AC.** Second-generation rodenticides and polecats (*Mustela putorius*) in Britain. *Environ Pollut*, 1996 ; 91(3) : 279-82.
- Shore RF, Birks JD, Afsar A, Wienburg CL, Kitchener AC.** Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. *Enviro Pollut*, 2003 ; 122 : 183-93.
- Schultz A.** Uric acid. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company ; 1984 ; 1261-6.
- Simon V.** Les rodenticides anticoagulants chez les ruminants : étude épidémiologique, clinique et expérimental. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*, Lyon, 2000 : 67.
- Singla N, Kaur G, Babbar BK, Sandhu BS.** Potential of triptolide in reproductive management of house rat, *Rattus rattus* (Linnaeus). *Integr Zool*, 2013 ; 8 : 260-76.

- Spiller HA, Gallenstein GL, Murphy MJ.** Dermal absorption of a liquid diphacinone rodenticide causing coagulaopathy. *Vet Hum Toxicol*, 2003 ; 45 : 313-4.
- Stafford DW.** The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*, 2005 ; 3(8) : 1873-8.
- Stephenson BM, Minot EO, Armstrong DP.** Fate of moreporks (*Ninox novaeseelandiae*) during a pest control operation on Mokoia Island, Lake Rotorua, North Island, New Zealand. *New Zealand J Ecol*, 1999 ; 23 : 233-40.
- Stephenson G.** Second thoughts on popular poison. *Forest and Bird*, 2000 ; 295 : 48.
- Stone WB, Okoniewski JC, Stedelin JR.** Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J Wildl Dis*, 1999 ; 35 : 187-93.
- Stone WB, Okoniewski JC, Stedelin JR.** Anticoagulant rodenticides and raptors: recent findings from New York, 1998-2001. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2003 ; 70 : 34-40.
- Svendsen SW, Kolstad HA, Steesby E.** Bleeding problems associated with occupational exposure to anticoagulant rodenticides. *Int Arch Occup Environ Health*, 2002 ; 75 : 515-7.

T

- Taylor DP.** The identification and detection of the rats in New Zealand and the eradication of ship rats on Tawhitinui Island. Dissertation for Diploma in Parks and Recreation, Lincoln College, Canterbury (unpublished). 1984 : 73.
- Taylor RH, Thomas BW.** Eradication of Norway rats (*Rattus norvegicus*) from Hawea Island, Fiordland, using brodifacoum. *New Zealand J Ecol*, 1989 ; 12 : 23-32.
- Taylor RH, Thomas BW.** Rats eradicated from rugged Breaksea Island (170 ha), Fiordland, New Zealand. *Biol Conserv*, 1993 ; 65 : 191-8.

- Thibault C, Levasseur MC.** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris: INRA, Ellipses, 1991.
- Thijssen HH, Ritzen B.** Acenocoumarol pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 2C9 genotype. *Clin pharmacol ther*, 2003 ; 74 : 61-8.
- Towns D, McFadden I, Lovegrove T.** Offshore islands co-operative conservation project with ICI Crop Care Division: Phase one (Stanley Island). Department of Conservation, Wellington. *Sci Res Intern Report*, 1993 ; 138 : 24.
- Townsend MG, Fletcher MR, Odam EM, Stanley PI.** An assessment of the secondary poisoning hazard of warfarin to tawny owls. *J Wildlife Manage*, 1981 ; 45 : 242-8.
- Treml F, Pejcoch M, Holesovska Z.** Small mammals – natural reservoir of pathogenic leptospires. *Veterinarni Medicina – Czech*, 2002 ; 47 : 309–14.
- Trinder P.** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Ann Clin Biochem*, 1969 ; 6 : 24-7.

U

- USEPA.** Registration Eligibility Decision (RED) Rodenticide Cluster. EPA 738-R-98-007. United States EPA, editors. United States: Environmental Protection Agency, 1998 : 296.

V

- Valchev I, Binev R, Yordanova V, Nikolov Y.** Anticoagulant Rodenticide Intoxication in Animals – A Review. *Turk J Vet Anim Sc*, 2008 ; 32(4) : 237-43.

- Vandenbroucke V, Bousquet-Melou A, De Backer P, Croubels S.** Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J Vet Pharmacol Ther*, 2008 ; 31(5) : 437-45.
- Veenstra GE, Owen DE, Huckle KR.** Metabolic and toxicological studies on the anticoagulant rodenticide flocoumafen. *Arch Toxicol*, 1991 ; 14(Suppl.) : 160-5.
- Vermeer C.** The vitamin K₁ dependent carboxylation reaction. *Mol Cell Biochem*, 1984 ; 61 : 17-35.
- Viallet S.** Actualités thérapeutiques sur l'intoxication par les rodenticides anticoagulants : comparaison de la cinétique plasmatique de la vitamine K₁ après administration intra-rectale et intraveineuse. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Université Claude Bernard, Lyon, 1998 : 86.
- Voils S.** Pharmacologic interventions for the management of critical bleeding. *Pharmacotherapy*, 2007 ; 27 (9 Pt 2) : 69S-84S.

W

- Waddell LS, Poppenga RH, Drobotz KJ.** Anticoagulant screening in dogs: 123 Cases. (1996-2003). *J Am Vet Med Assoc*, 2013 ; 242(4) : 516-21.
- Wallin R, Huston SM.** Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med*, 2004 ; 10 : 299-302.
- Weitzel JN, Sadowski JA, Furie BC, Moroosie R, Kim H, Mount ME, Murphy MJ, Furie B.** Surreptitious ingestion of a long-acting vitamin K antagonist/rodenticide, brodifacoum. Clinical and metabolic studies of three cases. *Blood*, 1990 ; 76 : 2555-9.

Whilton DS, Sadowski JA, Suttie JW. Mechanism of coumarin action: significance of vitamine K epoxide reductase inhibition. *Biochem*. 1978 ; 17(8): 1371-7.

Williams JM, Bell J, Ross WD, Broad TM. Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) control with a single application of 50 ppm brodifacoum cereal baits. *New Zealand J Ecol*. 1986 ; 9 : 123-36.

Wolfe G. Subchronic toxicity study in rats with sodium monofluoroacetate. Study No. HLA-2399-118. Conducted by Hazelton and cited in EPA Reregistration Eligibility Decision (RED) Sodium fluoroacetate. (Unpublished study), 1988.

Woody BJ, Murphy MJ, Ray AC, Green RA. Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. *J Vet Int Med*. 1992 ; 6(1) : 23-8.

Y

Young J, De Lai L. Population declines of predatory birds coincident with the introduction of Klerat Rodenticide in North Queensland. *Australian Bird Watcher*, 1997 ; 17 : 160-7.

Yu HY, Lin JL, Fu JF, Lin JH, Liu SH, Weng CH, Huang WH, Chen KH, Hsu CW, Yen TH. Outcomes of patients with rodenticide poisoning at a far east poison center. *Springerplus*. 2013 ; 2 : 505.

Z

Zidan NHA. Evaluation of the Reproductive Toxicity of Chlorpyrifos Methyl, Diazinon and Profenofos Pesticides in Male Rats. *Internat J Pharmacol*. 2009 ; 5(1) : 51-7.