



**HAL**  
open science

# Les populations invasives de rongeurs en milieu agricole : une étude menée dans des cultures de grande échelle, les plantations de palmiers à huile en Indonésie : Approche paysagère, génétique et écotoxicologique

Julie Andru

► **To cite this version:**

Julie Andru. Les populations invasives de rongeurs en milieu agricole : une étude menée dans des cultures de grande échelle, les plantations de palmiers à huile en Indonésie : Approche paysagère, génétique et écotoxicologique. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10303 . tel-00984597

**HAL Id: tel-00984597**

**<https://theses.hal.science/tel-00984597>**

Submitted on 28 Apr 2014

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

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

**THÈSE** de l'Université de Lyon

Pour l'obtention du **DIPLOME DE DOCTORAT** (arrêté du 7 août 2006) de l'Université Claude Bernard Lyon 1 - Ecole doctorale EDISS (Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)

Spécialité : Physiologie, Biologie des organismes, populations, interactions

**Les populations invasives de rongeurs en milieu agricole:  
une étude menée dans des cultures de grande échelle,  
les plantations de palmiers à huile en Indonésie**

**- Approche paysagère, génétique et écotoxicologique –**

Présentée publiquement le 21 décembre 2012 par :

**Julie ANDRU**

Sous la direction d'Etienne BENOIT (directeur de thèse), professeur à VetagroSup de Lyon, et de Jean-François COSSON (co-encadrant de thèse), chercheur au CBGP de Montferrier-sur-Lez

**JURY :**

Mylène WEILL (DR2, ISEM-CNRS, Université de Montpellier 2)	Rapporteur
Patrick GIRAUDOUX (PR, Université de Franche-Comté/ UMR 6249)	Rapporteur
Michel PASCAL (DR, UMR INRA-ESE, Campus de Beaulieu)	Rapporteur
Etienne BENOIT (PR, UMR INRA-ENVL 1233, Vetagro Sup de Lyon)	Directeur
Philippe BERNY (PR, UMR INRA-ENVL 1233, Vetagro Sup de Lyon)	Examineur
Jean-Pierre CALIMAN (PT-SMART, Jakarta, Indonésie)	Invité
Hervé CARUEL (Liphatech, Bonnel)	Invité
Jean-François COSSON (DR, UMR INRA-CBGP)	Examineur



**Les populations invasives de rongeurs en milieu agricole: une étude menée dans des cultures de grande échelle, les plantations de palmiers à huile en Indonésie.  
- approche paysagère, génétique et écotoxicologique -**

**Résumé.** Les perturbations environnementales d'origine anthropique favorisent l'établissement de populations invasives. La gestion de ces populations est primordiale pour la santé publique (zoonose, famine), l'environnement (perte de biodiversité), et l'économie (dégâts). L'objectif de cette thèse pluridisciplinaire, menée en conditions naturelles, est d'améliorer les connaissances sur les populations invasives de rongeurs dans des paysages agricoles à grande échelle et d'appréhender les mécanismes d'adaptation qui favorisent une réponse positive aux pressions anthropiques. Les résultats montrent que (1) le rat endémique *Rattus tiomanicus*, dont la présence est associée à la typologie de l'habitat naturel, et le rat introduit *Rattus tanezumi-R3*, dont la présence est associée aux activités humaines, constituent les populations invasives des plantations de palmier à huile en Indonésie; (2) leur distribution géographique clinale est probablement contemporaine à l'anthropisation des milieux, et suppose une compétition inter-spécifique; (3) ces grandes populations sont spatialement continues avec un flux génique limité par la distance géographique (caractérisées par un patron d'isolement par la distance) et potentiellement influencé par les transports routiers; (4) *R. tanezumi-R3* possède une forte résistance physiologique aux raticides AVK, dont l'origine n'est pas associée à une mutation génétique de la molécule cible mais probablement liée aux enzymes du métabolisme. Ces travaux soulignent des stratégies d'adaptations comportementales et physiologiques des populations invasives de rongeurs en milieux agricoles et procurent des bases pour l'élaboration de stratégies de lutte adaptée.

**Mots clés :** rat, *Rattus tanezumi*, *Rattus tiomanicus*, palmier à huile, barcoding, microsatellites, structure génétique, distribution, résistance aux pesticides, AVK, VKORC1

---

**Invasive populations of rodents in agricultural landscape: a study in crops at large-scale, the oil palm plantations in Indonesia - landscape, genetic and ecotoxicological approaches –**

**Summary:** Anthropogenic activities modulate landscape and promote the establishment of invasive populations. Management of these populations represents a major issue for public health (zoonotic disease, famine), environment (biodiversity loss) and economy (damages). This multidisciplinary thesis has been conducted in natural conditions on populations of rodents infesting agricultural landscapes at large scale. This work aims to understand biological mechanisms that promote adaptations to anthropogenic pressures. The results suggest that (1) two species may infest oil palm plantations in Indonesia: an endemic rat *Rattus tiomanicus* - which presence is associated with natural habitat typology - and an introduced rats *Rattus tanezumi-R3* - which occur in association with the Human Footprint- ; (2) clinal geographic distribution of these species is probably due to both phylogeography and contemporary human activities, and suggest interspecific competition; (3) genetic isolation by distance patterns among these populations, and restricted gene flow potentially influenced by road transport; (4) *R. tanezumi-R3* developed a strong physiological resistance to coumatetralyl under AVK exposure. This resistance is not associated with a genetic mutation of the target molecule, and may relate to metabolic enzymes. This work highlights behavioral and physiological adaptations of invasive populations of rodents in agricultural landscape, and thus provides scientific basis for integrated pest management.

**Key words:** rat, *Rattus tanezumi*, *Rattus tiomanicus*, oil palm, barcoding, microsatellites, spatial genetic structure, distribution, pesticide resistance, AVK, VKORC1



Cette thèse a fait l'objet d'une bourse CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) financée par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche via l'ANRT (Association Nationale pour la Recherche et la Technologie).

La convention CIFRE a été signée entre :

- un partenaire industriel : l'entreprise Liphatech spécialisée dans l'action anti-nuisibles, représentée par M. Romain Lasseur puis par Mme Assia Belhadj (encadrants industriels).

- un partenaire scientifique : l'unité INRA UMR 1233-ENVL "Mycotoxines et Toxicologie Comparée des Xénobiotiques"(MTCX), basée à VetAgro Sup sur le campus vétérinaire de Lyon à Marcy l'étoile et représentée par M. Etienne Benoît (directeur de thèse).

- un deuxième partenaire scientifique : l'unité mixte INRA-IRD-CIRAD UMR CBGP (Centre de Biologie pour la Gestion des Populations) de Montferrier-sur-Lez, représentée par M. Jean-François Cosson (co-encadrant de thèse).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse en Indonésie ont bénéficié du soutien logistique et financier de PT-SMART (Sinar Mas Agro Resources and Technology) représentée par M. Jean-Pierre Caliman. PT-SMART est une unité recherche de Sinar Mas, une société de plantations de palmiers à huile en Indonésie.



UMR INRA-ENVL 1233, Ecole Vétérinaire de Lyon  
1 avenue Bourgelat  
69280 Marcy l'étoile



CBGP  
Campus International de Baillarguet CS 30016  
34988 Montferrier-sur-Lez cedex



Liphatech  
Bonnell BP3  
47480 PONT DU CASSE



PT Sinar Mas Agro Resources and Technology Tbk  
(PT SMART Tbk) Plaza BII, Tower II, 30th Floor  
Jl. MH Thamrin No. 51, Jakarta 10350, Indonesia



## REMERCIEMENTS

---

Je remercie toutes les personnes qui m'ont soutenue, encouragée et aidée durant ma thèse.

Je remercie les créateurs de ce projet, Romain Lasseur, Etienne Benoît, Jean-François Cosson, Jean-Pierre Caliman et toutes les équipes associées (Liphatech, ENVL, CBGP, et PT-Smart).

Je remercie particulièrement :

Jean-Pierre Caliman pour sa collaboration, et qui m'a permis de réaliser un travail de terrain efficace.

Flavie Vanlerberghe et Jean-Marc Duplantier pour m'avoir accueilli au CBGP de Montferrier-sur-Lez.

Denis Bourguet pour m'avoir appris à rédiger un article scientifique.

Jean-Pierre Rossi et Karine Berthier pour leur aide inestimable qui m'a permis de finir ma thèse.

Imron et toutes les équipes indonésiennes, ainsi que Yannick Chaval et Maxime Galan pour leur aide technique.

L'ensemble des personnes qui m'ont accordé un peu de temps pour échanger des idées sur l'interprétation de mes résultats : Jean-François M, Philippe B, Ambroise, Bertrand, Benoit, Arnaud, Jean-Marc, Réjane...

Agnès, pour tes conseils de dernière minute avant la soutenance.

Mes amis d'Indonésie: Tony, Rustam, Julie V, Irina C, Eva, Roshna, Arwin, Atik, Candra, Zul, Kusyono...

Mes amis de Lyon: Agnès, Céline, John, Alex C, Audrey.... Bernadete, Michèle, Farah, Claire, Solange, Edwige, Julie...

Mes amis de Montpellier: Jean-François M, Julien V, Olivier, Ashraf, Emmanuel G, Florence, Xavier, Alex D, Anne X, Anne L, Bruno, Sylvain...

Mes amis de toujours : Maud, Fab, Marie-émilie, Benji... et toi JoE qui a su être patient dans ces derniers mois (les plus durs)

Mes amis d'ultimate frisbee qui m'ont aidé à garder le cap !

A toute ma famille, mes frères, ma belle-sœur, et mes parents qui ont toujours su me soutenir et à qui je dédie cette thèse.

On s'écroule, puis on se relève....

*Un hommage aussi à Mojo, le rat démineur de l'ONG HeroRat.*

## SOMMAIRE GENERAL

---

Productions scientifiques de la thèse .....	11
Table des illustrations .....	12
Abréviations .....	14
I. INTRODUCTION .....	17
I.1. Contexte général .....	17
I.2 Processus d'invasion biologique .....	20
I.3. Structure génétique spatiale d'une population invasive .....	30
I.4. Toxicologie des anticoagulants Antagonistes de la Vitamine K (AVK) .....	36
I.5. Conséquences biologiques des anticoagulant AVK .....	48
I.6. Problématique et objectifs de la thèse .....	59
II. MATERIELS ET METHODES .....	67
II.1. Echantillonnage.....	67
II.2. Influence des facteurs environnementaux sur la distribution des espèces .....	72
II.3. Patrons de distribution locale des espèces invasives.....	75
II.4. Évaluation de la résistance aux anticoagulants AVK .....	82
III. RESULTATS ET DISCUSSION .....	87
III.1. Distribution des espèces .....	87
III.2. Dispersion spatiale des populations en palmeraie .....	95
III.3. Résistance au coumatétralyl .....	105
IV. DISCUSSION .....	113
IV.1. Caractérisation des espèces et de leur distribution.....	113
IV.2. Dispersion spatiale des populations invasives .....	118
IV.3. Résistance au coumatétralyl .....	123
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	132
VI. ANNEXES .....	1366
VII. ARTICLE A. Publié dans Ecotoxicology 22: 377-386 .....	1400
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	1644

## TABLE DES MATIERES

---

Productions scientifiques de la thèse.....	11
Table des illustrations.....	12
Abréviations .....	14
I. INTRODUCTION .....	17
I.1. Contexte général.....	17
I.1.1. Invasion et éradication biologique.....	17
I.1.2. Gestion adaptée.....	18
I.1.3. Objectifs généraux de la thèse.....	19
I.2 Processus d'invasion biologique.....	20
I.2.1. Définition.....	20
I.2.2. Facteurs intrinsèques.....	22
I.2.3. Facteurs extrinsèques .....	24
I.2.4. Impacts.....	28
I.3. Structure génétique spatiale d'une population invasive.....	30
I.3.1. Dispersion spatiale .....	30
I.3.2. Structure génétique spatiale.....	32
I.3.3. Applications pour la gestion.....	34
I.4. Toxicologie des anticoagulants Antagonistes de la Vitamine K (AVK).....	36
I.4.1. Physiologie de la coagulation sanguine .....	37
I.4.2. Facteurs vitamine K-dépendants (VKD) .....	42
I.4.3. Cycle de la vitamine K .....	43
I.4.4. Mécanisme biochimique des AVK.....	45
I.5. Conséquences biologiques des anticoagulant AVK .....	48

I.5.1. Résistance aux pesticides : une adaptation induite par les pressions anthropiques .....	48
I.5.2. Mutations de la molécule cible (VKORC1) .....	51
I.5.3. Mutations des enzymes du métabolisme (CYP450).....	55
I.5.4. Coût biologique et intoxication secondaire .....	57
I.6. Problématique et objectifs de la thèse.....	59
I.6.1. Contexte d'étude : les plantations de palmiers à huile .....	59
I.6.2. Modèle d'étude : les rongeurs.....	61
I.6.3. Gestion des rongeurs .....	62
I.6.4. Objectifs de la thèse.....	63
II. MATERIELS ET METHODES .....	67
II.1. Echantillonnage .....	67
II.1.1. Sites d'étude .....	67
II.1.2. Méthode de capture et matériel biologique.....	70
II.1.3. Identification moléculaire des espèces.....	72
II.2. Influence des facteurs environnementaux sur la distribution des espèces .....	72
II.2.1. Jeux de données.....	72
II.2.2. Analyse statistique multivariée.....	74
II.3. Patrons de distribution locale des espèces invasives .....	75
II.3.1. Matériel biologique et géographique .....	75
II.3.2. Analyses statistiques.....	79
II.4. Évaluation de la résistance aux anticoagulants AVK .....	82
II.4.1. Sensibilité phénotypique au coumatétralyl .....	82
II.4.2. Amplification et séquençage de <i>vkorc1</i> .....	83
III. RESULTATS ET DISCUSSION .....	87
III.1. Distribution des espèces.....	87

III.1.1. Inventaire qualitatif des espèces .....	87
III.1.2. Influence des facteurs environnementaux .....	89
III.2. Dispersion spatiale des populations en palmeraie .....	95
III.2.1. Utilisation des différents habitats d'une palmeraie .....	95
III.2.2. Structure génétique des populations dans une palmeraie.....	99
III.3. Résistance au coumatétralyl.....	105
III.3.1. Résistance phénotypique au coumatétralyl .....	105
III.3.2. Polymorphisme génétique de <i>vkorc1</i> .....	107
IV. DISCUSSION.....	113
IV.1. Caractérisation des espèces et de leur distribution .....	113
IV.1.1. Identification des espèces .....	113
IV.1.2. Effets de l'environnement sur la distribution des espèces prédominantes.....	115
IV.2. Dispersion spatiale des populations invasives .....	118
IV.2.1. Occupation des habitats d'une palmeraie.....	118
IV.2.2. Dispersion spatiale dans la palmeraie .....	120
IV.3. Résistance au coumatétralyl .....	123
IV.3.1. Sensibilité au coumatétralyl .....	123
IV.3.2. Implications de <i>vkorc1</i> dans la sensibilité au coumatétralyl .....	127
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	132
VI. ANNEXES .....	136
Annexe I. Légende du jeu de données GlobCover et BioClim .....	136
Annexe II. Statistiques de base des populations de Riau, Bangka, et Irian Jaya .....	137
Annexe III. Structure génétique de Riau, Bangka, et Irian Jaya .....	138
VII. ARTICLE I. Publié dans <i>Ecotoxicology</i> 22:377-386.....	140
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	164

## PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES DE LA THESE

---

### ARTICLES INCLUS DANS CE MEMOIRE

**ARTICLE A.** Andru J., Cosson JF, Caliman JP, Benoit E. Coumatetralyl resistance of *Rattus tanezumi* infesting oil palm plantations in Indonesia. *Ecotoxicology* 22:377-386..... 123

### ARTICLES NON INCLUS DANS CE MEMOIRE

**ARTICLE B.** Andru J., Rossi JP, Galan M, Caliman JP, Cosson JF (*en préparation*) Environmental influence on rodent distribution in oil palm agricultural landscapes in Southeast Asia

**ARTICLE C.** Andru J., Berthier K, Gauffre B, Galan M, Caliman JP, Cosson JF (*en préparation*). Genetic structure of invasive population of rats infesting oil palm plantations in Indonesia

### PRESENTATIONS ORALES ET POSTERS

#### PRINCIPALES PRESENTATIONS ORALES

- ✓ Environmental influence on the composition of rat populations infesting oil palm agricultural landscapes in Southeast Asia. J. Andru, J.P. Rossi, K. Berthier, M. Galan, J.P. Caliman, E. Benoit, A. Belhadj, J.F. Cosson. **Vith European Congress of Mammalogy (ECM)**, 19-23 juillet 2011, Paris, France.
- ✓ Phénomène de résistance aux anticoagulants chez les rongeurs ravageurs des plantations de palmiers à huile en Indonésie. J. Andru, J.F. Cosson, J.P. Caliman, Y. Chaval, R. Lasseur, E. Benoit. **Ecologie 2010**. Premier colloque national d'écologie scientifique français, 2-4 septembre 2010, Montpellier, France.
- ✓ Phénomène de résistance aux anticoagulants chez les rongeurs ravageurs de palmiers à huile en Indonésie. J. Andru, J.F. Cosson, J.P. Caliman, Y. Chaval, R. Lasseur, E. Benoit. Journées scientifiques de l'école vétérinaire de Lyon. Avril 2010, Marcy l'étoile, France.
- ✓ Resistance phenomenon to anticoagulant of rats in oil palm plantations in Indonesia. J. Andru, J.F. Cosson, J.P. Caliman, Y. Chaval, R. Lasseur, E. Benoit. **VIIth European Vertebrate Pest Management Conference (EVPMC)**, 8th-12th september 2009, National Veterinary School of Lyon, France
- ✓ Rat populations study in the oil palm plantation. J. Andru. Bilan annuel devant le PDG de PT-SMART, unité recherche de Sinar Mas, M. Daud Darsono, juin 2009, Jakarta, Indonesia.

#### POSTER

- ✓ « Phénomène de résistance aux anticoagulants chez les rongeurs ravageurs des plantations de palmier à huile en Indonésie. » J. Andru, J.F. Cosson, J.P. Caliman, Sudharto, Y. Chaval, R. Lasseur, E. Benoit. Journées scientifique de l'EDISS (Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé), 17 mars 2010, Lyon, France. **Prix du meilleur poster.**

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

### TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> Mutations faux-sens de VKORC1 recensées chez le rat brun sauvage	53
<b>Tableau 2</b> Séquences des amorces des microsatellites	78
<b>Tableau 3</b> Identification des espèces de micromammifères dans les palmeraies	88
<b>Tableau 4</b> Espèces identifiées dans différents habitats à Irian Jaya et à Bangka	95
<b>Tableau 5</b> Valeur des $F_{ST}$ entre chaque paire de localités	101
<b>Tableau 6</b> Statistiques de base pour les trois populations de <i>Rattus</i>	101
<b>Tableau 7</b> Réponse phénotypique au coumatétralyl et mutations de l'exon 3 du gène <i>vkorc1</i>	108
<b>Tableau 8</b> Mutations SNP identifiées chez <i>Rattus tiomanicus</i> et <i>Rattus tanezumi-R3</i>	109

### FIGURES

<b>Figure 2</b> Schéma global d'un processus d'invasion biologique	22
<b>Figure 3</b> Schéma simplifié de sélection directionnelle	23
<b>Figure 5</b> Schéma de patrons de dispersion spatiale	34
<b>Figure 6</b> Hémostase primaire	39
<b>Figure 7</b> Hémostase secondaire	41
<b>Figure 8</b> Mécanisme de réaction de gamma-carboxylation	43
<b>Figure 9</b> Cycle de la vitamine K dans les cellules hépatiques	44
<b>Figure 12</b> Comparaison de la dose efficace pour trois populations théoriques	49
<b>Figure 13</b> Exemple de sélection directionnelle de la résistance aux AVK	50
<b>Figure 15</b> Voies métaboliques de la warfarine chez un rat mâle	56
<b>Figure 16</b> Quantités moyennes de production d'huile de palme	60
<b>Figure 18</b> Localisation géographique des sites d'échantillonnage	69
<b>Figure 19</b> Illustration d'une session de piégeage	71
<b>Figure 20</b> Illustration d'extraction des zones tampons (buffer)	75
<b>Figure 21</b> Echantillonnage des rats ayant servi aux analyses génétiques	76
<b>Figure 22</b> Taux de présence des espèces prédominantes dans les palmeraies	87
<b>Figure 23</b> Carte de distribution des espèces prédominantes dans les palmeraies	89
<b>Figure 24</b> Projection des variables sur le plan factoriel	91
<b>Figure 25</b> Projection géographique des valeurs absolues des coordonnées PC1	92
<b>Figure 26</b> Projection des sites sur le plan factoriel	94
<b>Figure 27</b> Proportions de captures	99
<b>Figure 28</b> Représentation graphique de l'analyse factorielle des correspondances (AFC)	100
<b>Figure 29</b> Structure génétique des populations de rats échantillonnées	103
<b>Figure 30</b> Corrélogrammes	104
<b>Figure 31</b> Réponse phénotypique au coumatétralyl	106

## ENCADRES

**Encadré 1** Techniques de lutttes anti-rongeurs

37

## ABREVIATIONS

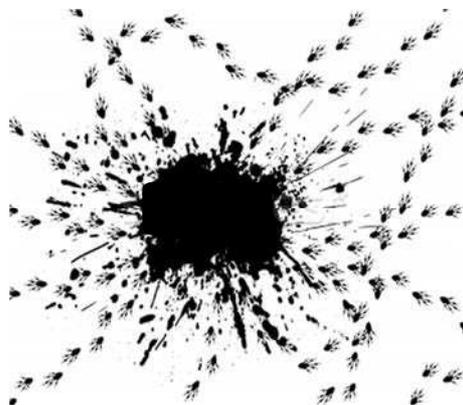
ADN	Acide Désoxyribonucléique	Molécule support de l'information génétique
AT	AntiThrombine	Inhibiteur de la coagulation
AVK	Antagoniste à la Vitamine-K	Catégorie d'anticoagulants
BCR	Blood Clotting time Response	Technique de mesure de la dose-réponse aux AVK
Bp	Paire de base	Unité de mesure des séquences d'ADN
CO1	Cytochrome C Oxydase sous-unité 1	Gène mitochondrial utilisé dans la technique du barcoding
Cys	Cystéine	Acide aminé possédant une molécule de soufre
ED <sub>50</sub>	Dose efficace	Dose d'un composé actif qui entraîne l'effet attendu chez 50% des sujets exposés
FI	Fibrinogène	Facteur de coagulation
FII	Prothrombine	Facteur de coagulation
FV	Proaccélélerine	Facteur de coagulation
FVII	Proconvertine	Facteur de coagulation
FVIII	Antihémophilique A	Facteur de coagulation
FIX	Antihémophilique B	Facteur de coagulation
FX	Facteur Stuart	Facteur de coagulation
FXI	Facteur Rosenthal	Facteur de coagulation
FXII	Facteur Hageman	Facteur de coagulation
FXIII	Stabilisant Fibrine	Facteur de coagulation
FT	Facteur Tissulaire	récepteur membranaire initiateur de coagulation
GGCX	Gamma-Glutamyl-Carboxylase	Enzyme qui modifie les VKD grâce à la vitamine K
IP	Intra-Péritonéale	à l'intérieur du péritoine
LD <sub>50</sub>	Dose létale	Dose d'un composé actif qui entraîne la mort chez 50% des sujets exposés
PC	Protéine C	Inhibiteur de la coagulation
PCR	Polymerase Chain Reaction	La réaction de polymérisation en chaîne est une technique d'amplification enzymatique d'un fragment d'ADN.
PIVKA	Protéine Induite par l'Absence de Vitamine K	Protéines VKD non gamma-carboxylées
PS	Protéine S	Inhibiteur de la coagulation
PT	Prothrombin Time	Mesure du temps de coagulation sanguine
R.	<i>Rattus</i>	Rat
Sec	seconde	Unité de temps
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Mutation ponctuelle d'un seul nucléotide
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor	Inhibiteur de la coagulation
TM	domaine Trans-Membranaire	Région d'une protéine localisée dans une membrane
VK	Vitamine K	Cofacteur de la GG CX
VKD	Vitamine K-Dépendant	Protéine dont la synthèse dépend de la vitamine K
VKH	Vitamine K Hydroquinone	Forme réduite de la vitamine K
VKO	Vitamine K épOxyde	Forme oxydée de la vitamine K
VKOR	Vitamine K-épOxyde Réductase	Complexe enzymatique qui réduit la vitamine K
VKORC1	Vitamine K-épOxyde Réductase sous-unité 1	Enzyme clé de VKOR

## INTRODUCTION

*« Je n'ai encore aucune donnée. Et bâtir une théorie avant d'avoir des données est une erreur monumentale : insensiblement on se met à torturer les faits pour qu'ils collent avec la théorie, alors que ce sont les théories qui doivent coller avec les faits. »*

Conan Doyle - 1956 - Les aventures de Sherlock Holmes

p. 11 « un scandale en Bohême »





## I. INTRODUCTION

---

### I.1. CONTEXTE GENERAL

#### I.1.1. INVASION ET ERADICATION BIOLOGIQUE

Les perturbations environnementales, telles que les activités humaines, peuvent modifier le fonctionnement des écosystèmes et la structure du paysage (Tylianakis *et al.* 2008). Certaines espèces possèdent et développent des mécanismes d'adaptation leur permettant de répondre positivement à ces modifications. Elles constituent dans certains cas des populations invasives.

Les invasions biologiques sont des processus qui aboutissent à la dominance biogéographique et/ou démographique d'une espèce souvent exogène (Colautti & MacIsaac 2004). Ces processus sont renforcés par les activités anthropiques, notamment par les importants flux de transports industriels qui ouvrent des voies d'invasions rapides. Les conséquences de ces processus sont souvent néfastes. Les invasions biologiques peuvent par exemple provoquer l'extinction d'espèces endémiques (Harris 2009), l'émergence de zoonoses (Mills & Childs 1998), ou engendrer des pertes économiques et alimentaires importantes (Normile 2010; Panwar *et al.* 2008 ; Singleton *et al.* 2003a). La gestion des populations invasives représente ainsi un enjeu de taille pour l'écologie, l'économie, et la santé publique. Elle est toutefois difficile à réaliser.

D'une part, comme le démontre une étude récente (Russel *et al.* 2005), il peut s'avérer extrêmement difficile d'éviter l'introduction d'une espèce potentiellement invasive. Cette étude consistait à capturer un rat brun libéré sur une île de 9,5 hectares. Malgré des efforts développés et variés (pièges, chasse, pesticides), le rongeur n'a pu être capturé qu'après quatre mois de traque intensive.

D'autre part, bien que des stratégies d'éradication d'espèces invasives de rongeurs aient été réalisées avec succès en milieu insulaire de petite taille (<100 ha) (Howald *et al.* 2007 ; Pascal *et al.* 2005), de telles stratégies s'avèrent souvent techniquement impossibles en milieu continental. De nombreuses invasions biologiques sont associées avec l'expansion des

milieux agricoles, où la plupart des espèces sont introduites par les activités humaines (Musser & Carleton 2005). Il est donc très difficile d'éradiquer ces populations invasives dont le flux d'introduction est perpétuellement maintenu par les transports humains.

---

### I.1.2. GESTION ADAPTEE

La difficulté de prévenir ou d'éradiquer l'établissement de populations invasives est un argument qui conduit souvent à utiliser des stratégies de gestion dites de « contrôle ». Lorsqu'une population invasive s'est établie, la meilleure stratégie consiste à limiter son expansion (démographique et territoriale) pour maintenir l'impact négatif de sa présence à un seuil acceptable en termes de dégâts occasionnés.

A ce jour, diverses stratégies ont été développées pour lutter contre les espèces invasives. La plupart sont principalement basées sur l'utilisation de pesticides de synthèse. Souvent pratique d'utilisation et très efficace dans les premiers temps, la contrepartie de cette stratégie se manifeste rapidement par l'apparition de phénomènes de résistance aux pesticides, et d'intoxications chez les organismes non ciblés, l'être humain et l'environnement (Dowding *et al.* 2010 ; Rogers *et al.* 1998) . Le développement de techniques de lutttes adaptées représente un enjeu important, autant pour maximiser l'efficacité de la lutte que pour limiter ses impacts écologiques et économiques.

Le principe d'une gestion adaptée repose sur les connaissances biologiques de l'espèce ciblée en conditions naturelles. En effet, plusieurs paramètres sont spécifiques de l'espèce invasive et de son habitat. Dans un premier temps, la connaissance de l'identité précise de l'espèce permet d'orienter le choix de la technique de lutte. Par exemple, le choix d'un prédateur naturel pour la lutte biologique, ou bien le choix d'une matière active pour la lutte chimique, car la sensibilité aux pesticides varie selon l'espèce (Watanabe *et al.* 2010).

Dans un second temps, la connaissance du comportement spatio-temporel des populations établies est importante pour déterminer les méthodes d'application des techniques de lutttes. Par exemple, le contrôle des rongeurs a une plus grande efficacité lorsqu'il est utilisé avant la période de reproduction et quand la population est constituée d'une grande cohorte de rats d'âge moyen avec un grand potentiel reproductif. Comprendre la dispersion spatiale des

populations dans l'environnement envahi permet d'adapter l'étendue des zones à contrôler, en prenant en compte les facteurs favorisant la recolonisation de l'habitat (e.g. flux de gènes, zones refuges). Par exemple, l'identification de zones refuges impliquées dans les cycles de pullulation du campagnol terrestre permet de mettre en place des techniques de gestions basée sur l'utilisation du paysage (Fichet-Calvet *et al.* 2000).

La connaissance des mécanismes de résistance aux pesticides permet également d'adapter les techniques de lutte chimique (e.g. intensité et fréquence d'application des pesticides, choix de la matière active) pour limiter l'apparition et la propagation de la résistance.

Les études en conditions naturelles sont indispensables pour améliorer les connaissances biologiques des populations invasives. Une bonne connaissance de ces populations conduit ainsi à une gestion adaptée, plus efficace, moins coûteuse, et moins néfaste pour l'environnement.

---

### I.1.3. OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE

Cette thèse se situe à l'interface des processus d'invasion biologique et des techniques d'éradications de populations invasives. L'objectif de cette thèse est d'étudier la biologie des populations invasives de rongeurs établies dans un milieu agricole à grande échelle. Les plantations de palmiers à huile en Indonésie constituent un modèle agricole pertinent dans l'étude de la lutte anti-rongeurs. En effet, l'étendue géographique de ces agro-écosystèmes de plusieurs milliers d'hectares, ainsi que l'importance des dégâts causés par les populations invasives de rongeurs, représentent des enjeux économiques et écologiques majeurs. Il s'agit d'appréhender ces populations afin de développer des stratégies de lutte adaptées.

Cette thèse s'inscrit dans la volonté de comprendre le fonctionnement des communautés de rongeurs ravageurs établies en milieu agricole, dont la gestion est potentiellement confrontée à des mécanismes de résistance aux pesticides. Ce travail de thèse s'appuie sur une démarche pluridisciplinaire pour répondre (1) au manque d'études sur les espèces concernées, (2) à la nécessité cruciale de conduire des études en conditions naturelles.

L'introduction de ce manuscrit est structurée en cinq parties.

- La première partie est une présentation générale des processus d'invasion et du modèle « rongeur invasif ».
- La deuxième partie présente un domaine d'étude aux applications multiples, la génétique des populations, qui représente aujourd'hui un outil utile pour la gestion des populations invasives (Rollins *et al.* 2006).
- La troisième partie décrit le principe d'action des pesticides couramment utilisés dans la lutte anti-rongeurs : les anticoagulants AVK.
- La quatrième partie concerne les conséquences d'une lutte aux anticoagulants AVK : les mécanismes de résistances, les coûts biologiques associés et les intoxications secondaires.
- Enfin, la cinquième partie présente le contexte de l'étude, les rongeurs ravageurs dans les plantations de palmiers à huile, et ses enjeux.

## I.2 PROCESSUS D'INVASION BIOLOGIQUE

### I.2.1. DEFINITION

La définition d'une espèce d'invasive varie selon les auteurs et les disciplines de recherche. De façon générale, le terme « espèces invasives » fait référence à des espèces dont l'abondance relative est localement dominante et/ou la distribution géographique est étendue (Colautti & MacIsaac 2004). La plupart des études font référence à des espèces exogènes, c'est-à-dire des espèces qui ont été introduites dans une aire biogéographique différente de leur aire native (Richardson *et al.* 2000). Toutefois, certaines espèces endémiques peuvent devenir envahissantes dans leur aire native suite à des perturbations environnementales (Mooney & Hobbs 2000 ; Van Auken 2000). Le phénomène d'invasion biologique peut donc concerner à la fois des espèces endémiques et des espèces introduites. Il est à noter que pour une même espèce introduite, la population peut devenir ou non invasive selon le contexte

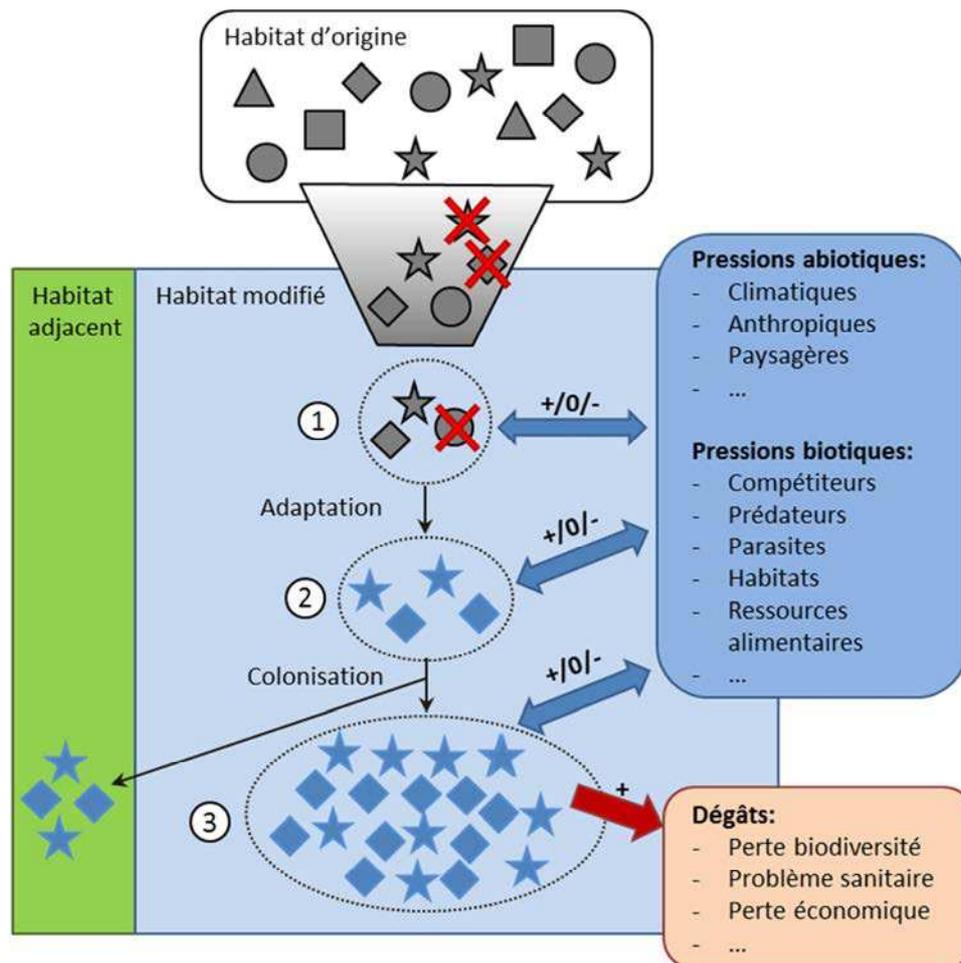
environnemental. Dans l'attente d'un consensus, et en considérant l'espèce dans sa globalité, le terme « population invasive » sera préférentiellement utilisé dans le reste de l'introduction.

Une population invasive peut spontanément coloniser un nouvel habitat ou son habitat d'origine ayant subi des modifications (Van Auken 2000). Elle peut également y être introduite, volontairement ou involontairement, par les activités humaines. Une étude intéressante a mis en évidence l'association des voies de colonisation d'une espèce de rat asiatique *Rattus exulans* avec celles de l'homme dans l'archipel polynésien (Matisoo-Smith & Robins 2004). Les hommes auraient emporté ces rongeurs comme ressource alimentaire pendant leurs voyages vers ces îles. Une invasion biologique peut donc être d'origine naturelle ou anthropique.

Le processus d'invasion se décompose en plusieurs étapes successives dont les trois principales sont l'introduction, l'établissement et l'expansion d'une population dans un nouvel environnement (Kolar & Lodge 2001).

Une population doit survivre à chaque étape pour se reproduire et se propager. Ainsi, avant d'envahir un nouvel environnement, une population doit traverser plusieurs filtres représentés par des barrières géographiques, des barrières environnementales (abiotique et biotique), des barrières reproductives, des barrières de dispersion locales, et parfois des barrières climatiques (Richardson *et al.* 2000).

La « règle des dix » élaborée par Williamson et Fitter (1996) estime que sur 1 000 espèces importées, 10 pourront être considérées comme introduites, 10 seront réellement naturalisées et une seule deviendra envahissante (Figure 2). Dans sa globalité, le succès d'une invasion dépend des capacités d'adaptation de la population à un nouvel environnement et des pressions environnementales. En d'autres termes, l'invasion dépend des caractéristiques intrinsèques de la population et des contraintes extrinsèques à celle-ci.

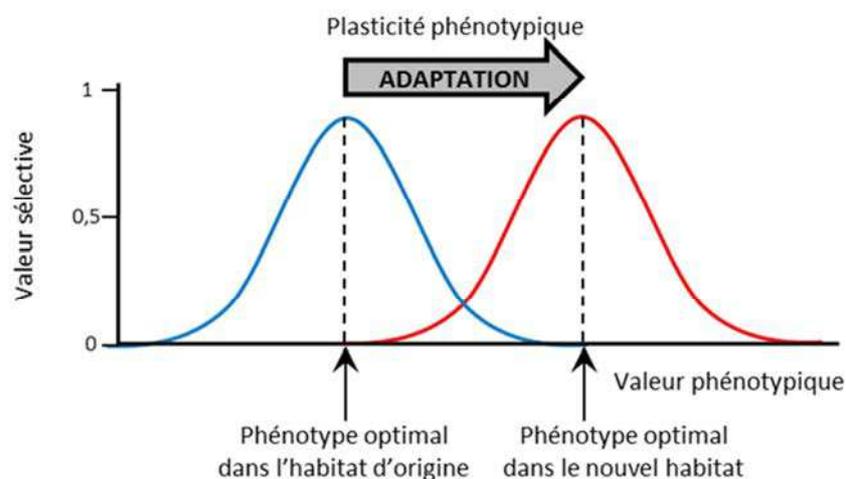


**Figure 2. Schéma global d'un processus d'invasion biologique.** Un certain nombre d'individus, issus d'une population origine, survivent à la phase d'introduction (1). Parmi ces individus, certains développent des adaptations sous les pressions environnementales, biotiques et abiotiques, pour constituer une population établie capable de survivre et de se reproduire (2). La population devient invasive, abonde et colonise de nouveaux habitats, provoquant des dégâts sur l'environnement (3).

### I.2.2. FACTEURS INTRINSEQUES

Toutes les espèces ne fondent pas des populations invasives. La réponse idiosyncrasique des populations face à des perturbations environnementales dépend de leur fitness dans ce nouvel environnement. La fitness (ou valeur sélective) correspond à la capacité de survivre, de se reproduire et de propager ses gènes dans un environnement donné. Lorsque la matrice environnementale où évolue une population est modifiée, par exemple par la création de milieux agricoles, seules les espèces adaptées peuvent se maintenir dans ce nouvel écosystème.

Les mécanismes d'adaptation consistent à améliorer la fitness d'une population dans son environnement par un ajustement de traits fonctionnels (comportementaux, morphologiques, physiologiques). Ce sont des traits héréditaires (génétiques) irréversibles soumis à la sélection naturelle. Lorsque l'écosystème est modifié, la valeur optimale d'un phénotype donné peut être modifiée. Ainsi, les caractères phénotypiques les plus avantageux dans un certain contexte ne le sont pas forcément dans un autre (Figure 3). Une population introduite dans une nouvelle matrice environnementale peut donc évoluer de façon à améliorer sa valeur sélective.



**Figure 3. Schéma simplifié de sélection directionnelle.** Ce schéma illustre l'importance des mécanismes d'adaptation lorsqu'une population est introduite dans un nouvel habitat, aux caractéristiques environnementales différentes. Un individu ayant conservé un phénotype de l'habitat d'origine (courbe bleue) sera contre-sélectionné et devra améliorer sa valeur sélective en fonction des nouvelles contraintes (courbe rouge): s'adapter pour survivre.

La plasticité phénotypique est une composante importante pour le processus d'adaptation d'une population à un environnement (Davidson *et al.* 2011). Richards *et al.* (2006) ont proposé un modèle dans lequel ils décrivent différentes stratégies de plasticité phénotypique (morphologiques et physiologiques). Le premier modèle décrit une population invasive robuste qui a la capacité de maintenir une fitness relativement constante dans des conditions défavorables. Ce modèle permettrait une large gamme d'environnements (Jack-of-all-trades). Le second modèle décrit une population invasive opportuniste qui a la capacité d'augmenter sa fitness dans des conditions favorables (Master-of-some). Le troisième modèle regroupe les

capacités des deux précédents modèles (Jack-and-master). Une méta-analyse sur les plantes a montré que les populations invasives ont une plasticité significativement supérieure par rapport aux non-invasives, surtout quand les ressources sont abondantes, alors que ces dernières ont une meilleure fitness quand les ressources sont normales ou faibles (Davidson *et al.* 2011).

Par ailleurs, une population introduite peut être préadaptée au nouvel environnement si les conditions sont similaires à son environnement natif. Sinon, elle doit développer des mécanismes d'adaptations face aux nouvelles contraintes environnementales. Il a récemment été démontré qu'une population invasive de fourmis tropicales *Wasmania auropunctata* se serait adaptée au froid dans une région de son aire native avant d'envahir une région méditerranéenne (Rey *et al.* 2012).

Les populations invasives concernent souvent des espèces possédant un fort potentiel adaptatif, pouvant s'adapter à une large gamme d'environnements. D'autres caractéristiques biologiques contribuent au potentiel invasif d'une population. Par exemple chez les animaux, il est suggéré qu'une espèce dont le régime alimentaire est généraliste est avantagée par rapport à une espèce dont le régime alimentaire est spécialiste, car elle sera capable d'adapter son alimentation dans une gamme d'environnements variés. De même l'optimisation de la taille et de la fréquence des portées représenterait un atout pour envahir. Une espèce à croissance rapide dont le taux de reproduction est élevé, serait capable d'envahir rapidement un nouvel environnement favorable, en augmentant sa vitesse d'adaptation et de dispersion.

---

### I.2.3. FACTEURS EXTRINSEQUES

Les populations évoluent dans un environnement qui conditionne leur survie, leur reproduction et leur dispersion. Les paramètres environnementaux constituent ainsi des facteurs régulateurs des processus d'invasion. Si les paramètres sont favorables à l'adaptation de la population introduite, ils augmentent la possibilité de son établissement et potentiellement sa propagation. Au contraire, si les paramètres environnementaux sont défavorables, ils peuvent limiter son expansion, voire empêcher son établissement. On peut

distinguer l'environnement local où s'établissent les populations, et l'environnement régional où se propagent les populations.

L'environnement est défini comme une matrice dans laquelle évoluent les individus d'une population. La matrice environnementale est caractérisée par deux grandes catégories de paramètres : les paramètres biotiques (i.e. biologiques) et abiotiques (i.e. physico-chimiques).

**Les facteurs biotiques** concernent l'ensemble des entités biologiques présentes dans le milieu. Les espèces végétales constituent par exemple les ressources alimentaires et les habitats (biomes) nécessaires à la survie des populations animales. Les espèces animales représentent notamment les prédateurs et les compétiteurs qui peuvent limiter la survie des populations. Un réseau d'interactions complexes s'établit ainsi entre les individus d'une population introduite et le nouvel environnement dans lequel elle évolue. La nature de ces interactions bidirectionnelles peut être positive (facilitation), neutre (sans effet) ou négative (inhibition). Une perturbation de l'équilibre de ces interactions peut être l'origine ou la conséquence d'une invasion biologique (Figure 2). De nombreuses invasions biologiques ont été rapportées en milieux insulaires, où les interactions interspécifiques entre la population invasive et le nouvel environnement sont limitées, dépourvu de prédateurs ou de compétiteurs de l'espèce nouvellement introduites. Il est souvent rapporté que les populations invasives sont très compétitrices (Sax & Brown 2000, Vilà & Weiner 2004).

**Les facteurs abiotiques** définissent les caractères non biologiques d'un environnement, tels que les caractères climatiques (e.g. températures, précipitations) et les caractères édaphiques qui représentent la nature des sols (e.g. pH, humidité). Les paramètres abiotiques sont déterminants pour la distribution des espèces. Par exemple, les températures modulent directement la survie d'une espèce dont les gammes de tolérance sont limitées. De plus, les paramètres abiotiques exercent une pression indirecte sur les populations en influençant les paramètres biotiques de leur environnement. Il est depuis longtemps admis que la distribution des espèces végétales est dépendante des climats, à grande et à petite échelle (macroclimats et microclimats) (Humboldt 1805).

A grande échelle par exemple, les paramètres climatiques déterminent les types de couverture végétale dont dépend la survie d'une population. Les caractéristiques climatiques permettent ainsi d'identifier des catégories d'habitats quel que soit leur position géographique. Indirectement ces paramètres sont donc très informatifs sur les populations pouvant occuper ses différents habitats.

A plus petite échelle, un type d'habitat est soumis à des conditions climatiques plus ou moins variables selon sa localité géographique. En Europe par exemple, les saisons hivernales sont plus longues et intenses au nord qu'au sud. Ainsi, une adaptation alimentaire a été suggérée chez une espèce de rongeur européen *Apodemus sp.*, dont la forme des mandibules varie selon un gradient latitudinal (Renaud & Michaux 2003). Les auteurs ont suggéré que les populations des régions nordiques, soumises à de plus longues périodes hivernales, auraient développées une alimentation plus diversifiée pour survivre à ces périodes dépourvues de graines (leur principale ressource alimentaire). Les espèces tolérantes à une grande gamme de climats et d'habitats sont de bonnes candidates à l'invasion de nouvelles régions (Swincer 1986).

Les **facteurs anthropiques** sont également à prendre en considération dans les processus d'invasions biologiques. Tout d'abord, les migrations humaines sont souvent à l'origine de l'introduction d'espèces dans de nouvelles aires géographiques, par exemple par les transports commerciaux ou la création de milieux agricoles (Hulme 2009).

Ensuite, ils influencent indirectement ou directement les facteurs biotiques et abiotiques d'un environnement. Il a été montré par exemple que les activités humaines accélèrent le processus de réchauffement climatique. Celui-ci peut favoriser indirectement les processus d'invasion en permettant la dispersion spatiale des populations invasives dans des nouvelles aires géographiques, et en modifiant les interactions biotiques (Walther *et al.* 2002).

Les perturbations anthropiques effectuent aussi directement de fortes pressions sur la matrice environnementale. Il est souvent rapporté que la fragmentation de l'habitat, due par exemple à la création de systèmes agricoles à grande échelle, modifie drastiquement le paysage et provoque une disparition d'habitats naturels et des espèces qui les occupent. La perte de biodiversité ainsi générée crée un contexte dépourvu de prédateurs ou de compétiteurs,

augmentant ainsi le risque d'explosion démographique des espèces adaptées à ce nouvel environnement.

Les paramètres environnementaux (macroclimat, facteurs biotiques et abiotiques locaux) et anthropiques constituent des facteurs régulateurs du succès d'une invasion. Définir les facteurs favorables à l'établissement d'une population invasive constitue une approche de base pour prédire les risques d'invasions biologiques. Les **approches corrélatives et mécanistiques** sont deux méthodes complémentaires permettant de modéliser et de prédire la distribution des espèces en réponse aux modifications environnementales (Buckley *et al.* 2010).

L'approche corrélative associe les données sur la présence géographique des espèces aux données environnementales des localités où elles ont été inventoriées. L'approche mécanistique utilise les données intrinsèques à l'espèce (e.g. gammes de tolérance au froid) couplées aux données environnementales (e.g. amplitudes thermiques) indépendamment de l'origine géographiques des échantillons.

Ainsi, l'approche corrélative modélise les habitats favorables à l'établissement d'une espèce alors que l'approche mécanistique modélise les niches écologiques (Kearney 2006). Un habitat décrit l'endroit physique (paramètres abiotiques) où un organisme vit ou peut potentiellement vivre, à une échelle spatio-temporelle donnée. Une niche correspond au sous-ensemble des conditions environnementales qui influencent un organisme, où la moyenne absolue de la fitness des individus est supérieure ou identique à 1. Les niches écologiques définissent donc un ensemble des conditions environnementales telles qu'une espèce donnée peut former des populations viables.

On distingue les niches écologiques fondamentales des niches écologiques réalisées, qui constituent les zones biogéographiques réellement occupées par l'espèce. En effet, les interactions interspécifiques (e.g. compétition) et la présence de barrières géographiques (e.g. mer) limitent la dispersion spatiale des espèces au cours de leur histoire évolutive. Les activités humaines récemment amplifiées, favorisent la dispersion spatiale et sont ainsi souvent responsables des processus d'invasion biologique. Les milieux agricoles à grande échelle réduisent la diversité biologique, permettant l'établissement de nouvelles populations

dans des niches écologiques vides, dépourvues de compétiteurs ou de prédateurs (Shea & Chesson 2002).

La connaissance des facteurs nécessaires à la survie d'une population invasive constitue un outil de lutte intéressant en matière de prévention pour limiter l'introduction et la propagation de telles populations.

---

#### I.2.4. IMPACTS

Les invasions biologiques, dont le succès dépend des facteurs précédemment énoncés, a des conséquences parfois désastreuses. Elles sont considérées comme étant la seconde cause de perte de biodiversité mondiale, après la destruction des habitats (Mooney & Hobbs 2000).

Les mammifères à l'origine de populations invasives à travers le monde sont principalement des rongeurs. Toutes les espèces de rongeurs ne constituent pas une menace majeure pour l'économie et l'environnement. Les rongeurs représentent plus de 42% des espèces de mammifères au monde (Aplin *et al.* 2003). Leur rôle écologique est primordial dans un écosystème. Dans la chaîne alimentaire, ils sont consommateurs de plantes et de champignons, et constituent les proies d'un grand nombre de prédateurs. Ils participent également à la pollinisation, la dispersion des graines, et l'aération des sols par leurs activités souterraines.

Bien que souvent bénéfiques dans l'écosystème, quelques espèces se sont adaptées aux environnements anthropiques et certaines populations sont devenues invasives. A ce jour, le rat noir *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) et le rat brun *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) ont une distribution géographique quasi-mondiale et constituent des populations invasives à l'origine d'importants dégâts. Certaines espèces de rongeurs représentent ainsi un très bon modèle d'étude d'invasion biologique.

Les populations invasives de rats ont des conséquences écologiques (perte de biodiversité), économiques (dégâts agricoles) et humaines (émergence de zoonoses, famine) dramatiques.

En effet, ces populations peuvent être à l'origine de modifications écologiques et conduire à l'extinction d'espèces endémiques en exerçant des fortes pressions de prédation et de compétition. Quatre espèces de rongeurs ont été identifiées comme responsables d'extinctions de onze espèces endémiques en milieu insulaire : le rat brun (*Rattus norvegicus*), le rat noir (*Rattus rattus*), le rat polynésien (*Rattus exulans*, Peale, 1848), et la souris domestique (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758). Le rat noir est impliqué dans la majorité des impacts (Harris 2009). Le transport humain est souvent responsable de l'introduction de ces espèces dans les îles. En effet, ces quatre espèces se sont adaptées aux pressions anthropiques et sont devenues commensales de l'homme.

Le rat noir est une espèce généraliste qui se reproduit très rapidement. Dans un environnement favorable, une femelle peut être à l'origine de 200 descendants en six mois (National Geographic 2009). Cette espèce est à l'origine de nombreuses invasions biologiques à travers le monde. Elle est considérée responsable de certains épisodes de famine en Inde à travers les dégâts occasionnés sur les bambous (Panwar *et al.* 2008). Dans les rizières, les rongeurs provoquent des dégâts importants sur les récoltes (5 à 10% de la production de riz), et il a été estimé que ces pertes annuelles pourraient nourrir 240 millions d'êtres humains chaque année (Normile 2010; Singleton *et al.* 2003a). Dans le sud-est asiatique, il existe plus de 418 espèces de rongeurs, dont 65 causes de sérieux dégâts sur les productions agricoles (Singleton *et al.* 2003b). En plus des impacts alimentaires, ces dégâts représentent des pertes économiques importantes et parfois même dramatiques pour les agriculteurs.

De plus, les rongeurs qui vivent à proximité de l'homme sont vecteurs de plus de 60 zoonoses (i.e. maladies transmissibles à l'homme). Parmi ces nombreuses maladies, la plus connue est la peste, qui a été à l'origine d'épidémies dramatiques en Europe (exterminant 30 % à 50 % de la population européenne) et qui sévit encore en Afrique. La leptospirose, le typhus, les hantavirus et les arenavirus sont d'autres maladies zoonotiques transmises par les rongeurs qui sont potentiellement mortelles (Mills & Childs 1998; Ostfeld & Holt 2004; Plyusnina *et al.* 2009). Durant l'année 2000, 14 000 cas de leptospiroses ont été recensés en Thaïlande et

365 décès ont été recensés parmi les cultivateurs de riz. Entre les années 1995 et 2000, au moins 25 nouveaux hantavirus et arenavirus ont été identifiés (Singleton *et al.* 2003b).

Prévenir et limiter ces fléaux représente un enjeu important. Le rat noir a récemment été inscrit sur la liste des « 100 espèces exogènes les plus nuisibles au monde » (Lowe *et al.* 2000).

### **I.3. STRUCTURE GENETIQUE SPATIALE D'UNE POPULATION INVASIVE**

#### **I.3.1. DISPERSION SPATIALE**

Cette première partie de l'introduction a souligné l'importance de deux mécanismes sous-jacents des processus d'invasion : l'adaptation aux contraintes environnementales, qui conditionne la survie des individus d'une population, et la dispersion, qui permet l'introduction et la colonisation d'une population dans un habitat et éventuellement les habitats adjacents. La dispersion est un processus fondamental qui influence la réponse d'une population aux modifications environnementales et à la fragmentation de l'habitat. Un autre mécanisme tout aussi important est la reproduction, qui permet le maintien temporel d'une population. La reproduction est également responsable de la transmission des adaptations dans une population et de l'explosion démographique à l'origine de l'invasion spatiale d'un habitat.

D'un point de vue théorique tous les individus qui constituent ces populations appartiennent à la même espèce et sont, par définition, capables de se reproduire entre eux. La reproduction permet l'échange de gènes au sein d'une population. En conditions naturelles, tous les individus d'une population ne se reproduisent pas entre eux et plusieurs paramètres sont susceptibles de limiter ces échanges de gènes. D'une part, la distance géographique elle-même limite la probabilité de croisement entre individus très éloignés. D'autre part, l'isolement géographique, lié par exemple à l'existence d'une route ou d'une rivière, peut

constituer une barrière relativement infranchissable et ainsi limiter la dispersion, et donc la possibilité de reproduction entre des individus. Un tel phénomène a récemment été observé chez un rongeur nord-américain, le tamia rayé *Tamias striatus* dont la dispersion est fortement limitée par les rivières (Chambers & Garant 2010). Les contraintes de l'habitat agissent ainsi sur l'intensité du flux de gènes (i.e. échanges de gènes lors de la reproduction), la démographie locale, les voies possibles de migration, et la sélection de différents traits (cf partie I.2.2). L'isolement écologique peut aussi représenter une barrière à la reproduction, par exemple chez des plantes dont la floraison est différée à cause d'une composition des sols disparate de l'habitat.

Le fonctionnement social d'une espèce est également un facteur qui influence les mécanismes de reproduction et la dispersion spatiale des individus. Par exemple, chez deux espèces de rongeurs, le campagnol des champs *Microtus arvalis*, et le tuco-tuco méridional *Ctenomys australis*, les femelles ont une distance de dispersion plus faible que les mâles qui parcourent de longues distances pour se reproduire (Mora *et al.* 2010, Gauffre *et al.* 2009). Certaines espèces ont des fonctionnements grégaires basés sur la formation de groupes d'individus au sein d'une population (e.g. colonies, troupeau) et vont préférentiellement se reproduire avec les individus du même groupe, et inversement certaines espèces ont tendance à se reproduire avec des congénères très éloignés (géographiquement et génétiquement).

L'ensemble de ces paramètres conduit souvent à ce que les populations soient spatialement structurées dans un environnement. Comprendre la dynamique de la dispersion spatiale des populations invasives est primordial pour adapter des techniques de luttés efficaces. En effet, déterminer l'organisation spatiale d'une population invasive permet d'identifier d'éventuelles sous-populations, pouvant constituer des unités d'éradications, et de détecter des zones refuges, impliquées dans les processus de recolonisation après une pression de contrôle.

Il existe deux types d'approches pour l'étude de la structure spatiale des populations en conditions naturelles : l'approche directe et l'approche indirecte.

L'approche directe est généralement basée sur des observations, des techniques de télémétrie, ou de capture-marquage-recapture. Les mesures de densité ont par exemple permis de

caractériser les cycles de pullulation du campagnol *Arvicola terrestris scherman* dans le département du Doubs (Giraudoux *et al.* 1997). Bien qu'elles soient souvent onéreuses et chronophages, elles ne sont pas invasives pour les animaux et ont l'avantage supplémentaire de prendre en compte l'identité des individus étudiés (e.g. sexe, âge). Cependant, les observations d'une population en conditions naturelles peuvent s'avérer difficile lorsqu'il s'agit d'espèces mobiles difficiles à observer (e.g. discrète, de petite taille, nocturne). De plus, les migrants à « longue distance » ne sont pas toujours détectables, et les taux et distances de migration sont souvent sous-estimés.

La génétique des populations est une approche complémentaire qui permet d'étudier la structure spatiale d'une population dans son environnement. C'est une méthode indirecte car elle est basée sur une analyse génétique de l'apparentement des individus échantillonnés en fonction de leur localisation dans l'espace. Elle permet d'intégrer tous les évènements spatio-temporels de la dispersion par un seul échantillonnage. C'est une méthode moins contraignante en temps et en main d'œuvre qui s'est beaucoup développée ces dernières années grâce aux avancées techniques et statistiques. Cependant, elle souffre souvent du manque d'information sur l'âge de la dispersion.

---

### I.3.2. STRUCTURE GENETIQUE SPATIALE

La génétique des populations est une vaste discipline de recherche qui permet entre autre d'étudier les distances physiques qui séparent un parent de sa progéniture et reflète les capacités de dispersion spatiale d'une population. Elle permet de répondre à des questions cruciales pour la gestion des populations invasives, telles que : Combien de populations ou sous-populations sont représentées dans une invasion ? Comment sont-elles spatialement organisées et connectées dans le milieu envahi ? Quelle est l'origine géographique des individus invasifs et quels ont été les épisodes d'introduction ?

Elle regroupe les théories de la sélection naturelle de Darwin et de l'hérédité de Mendel. Elle repose sur un modèle de population idéale (loi de Hardy-Weinberg) : une population panmictique (les gamètes s'associent au hasard), de taille infinie, sans contrainte évolutive

(sélection, mutation, migration, dérive). Dans une population idéale, les fréquences alléliques sont maintenues constantes de génération en génération. Des fréquences alléliques en déséquilibre peuvent ainsi donner des informations sur le statut d'une population. Par exemple, pour une espèce diploïde, un excès d'individus homozygotes par rapport aux proportions attendues dans une population idéale (« à l'équilibre »), correspond à un fort taux de consanguinité (reproduction entre individus apparentés). Un tel type de population peut en outre caractériser un effet Wallhund, c'est-à-dire que la population est structurée en sous-unités (i.e. dèmes).

A partir d'un échantillon d'individus, les méthodes statistiques d'inférences bayésiennes permettent de regrouper les individus dans des populations idéales, sans tenir compte de leur origine géographique (Pritchard *et al.* 2000 ; Falush *et al.* 2003). Cette méthode, appelée test d'assignation, permet de définir sans à priori un certain nombre de populations dans la zone échantillonnée.

Plusieurs modèles ont été élaborés pour comprendre comment sont spatialement structurées ces populations. Ils reposent sur la notion de dème, qui définit une sous-unité d'une population, et de cohésion entre dèmes (i.e. flux de gènes), qui correspond aux migrants qui s'y reproduisent. Plusieurs modèles de structure de population ont été élaborés. Les plus connus sont : le modèle de population en île (Wright, 1951), le modèle de population en treillis (Kimura & Weiss 1964 ; Kimura 1953), et le modèle d'isolement par la distance (Wright 1943 ; Wright 1946). Le modèle de population en île considère que chaque dème a la même probabilité d'échanger des individus, quel que soit sa localisation géographique, et que les échanges entre chaque dème contiennent une proportion identique d'individus. Le modèle de population en treillis, ou « stepping-stone », suppose que la probabilité d'échange d'individus entre deux dèmes est inversement proportionnelle à la distance qui les sépare. Le modèle d'isolement par la distance rejoint le modèle précédent appliqué à une population continue. Dans ces deux derniers modèles, la distance génétique entre les individus augmente avec la distance géographique qui les sépare.

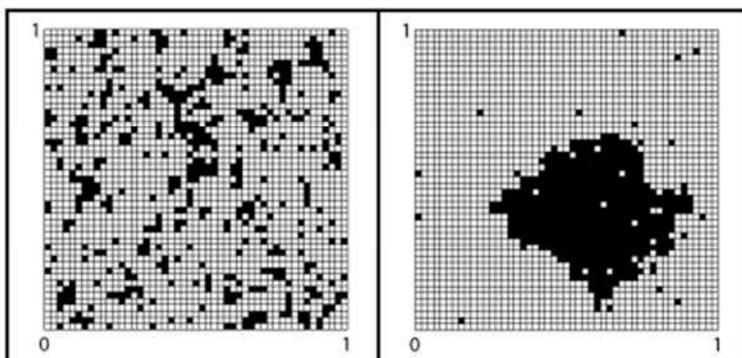
Il existe différents marqueurs génétiques permettant ce type d'études (e.g. isozyme, SNP, Indels, RFLP). Les marqueurs microsatellites sont les plus utilisés car ils sont très

polymorphes et « neutres », c'est-à-dire non soumis à la pression de sélection naturelle et permettent ainsi d'identifier des individus apparentés (Queller *et al.* 1993 ; Jarne & Lagoda 1996). Ce sont des séquences hypervariables de l'ADN nucléaire composées de répétitions de courts motifs de nucléotides (e.g. AT) dont la mutation consiste en l'ajout ou la soustraction d'un ou plusieurs motifs.

### I.3.3. APPLICATIONS POUR LA GESTION

Jusqu'à présent, la génétique des populations était un outil principalement utilisé dans le domaine de la conservation. Il permettait de déterminer les zones à protéger pour maintenir la viabilité d'une population menacée dans un habitat perturbé. Cet outil est depuis peu transposé à la lutte contre les populations invasives (Rollins *et al.* 2006).

Ainsi la méthode de génétique des populations décrite précédemment permet de définir la structure d'une population selon un modèle discret (e.g. modèle en île, stepping stone) ou continu (isolement par la distance), à partir duquel il est possible d'élaborer des stratégies de gestion adaptées (Figure 5).



**Figure 5. Schéma de patrons de dispersion spatiale** d'une population. L'habitat est représenté sous forme de grille et les individus sont représentés en carrés noirs. A gauche, les individus semblent dispersés aléatoirement dans l'habitat, et à droite ils sont spatialement regroupés en un patch dense (dème).

Dans un modèle discret, des unités populationnelles (dèmes) qui structurent l'ensemble de la population peuvent représenter des « unités d'éradication » dans la lutte contre les populations invasives et permettre aux gestionnaires de développer des stratégies de lutte efficace

(Abdelkrim *et al.* 2005a ; Plasboll *et al.* 2007). Appréhender le flux génique qui maintient la cohésion entre ces dèmes est un facteur à ne pas négliger dans cette approche, car il est souvent à l'origine de processus de recolonisation. En effet, l'éradication d'un dème libère un territoire qui peut être rapidement colonisé par les individus des dèmes adjacents et conduire à l'établissement d'un nouveau dème. Le degré de cette connexion définit l'échelle spatiale nécessaire pour le succès de l'éradication. Ainsi, chez le rat brun *Rattus norvegicus* une étude réalisée sur l'île South Georgia a permis de définir que la population était assez isolée et constituait une petite unité d'éradication (Robertson & Gemmell 2004), alors qu'une autre étude réalisée dans les îles bretonnes a montré que les populations étaient très connectées entre les différentes îles et définissaient une grande unité d'éradication (Abdelkrim *et al.* 2005b).

Dans un modèle continu, les populations sont diffuses et ne montrent pas de structures en dèmes interconnectés. Ces populations sont géographiquement ou démographiquement grandes et ne permettent pas de délimiter des unités d'éradication à proprement parler. Une gestion de contrôle semble plus réaliste pour appréhender ce modèle et réduire la taille de la population (Myers *et al.* 2000 ; Spencer & Woolnough 2004).

Le développement des techniques moléculaires a permis d'élargir le champ des connaissances sur les problèmes liés aux invasions biologiques (e.g. origine d'une invasion, unité d'éradication), constituant ainsi un outil précieux pour aider à la décision d'une stratégie de lutte adaptée, comme prévenir les invasions en bloquant les voies d'introduction, ou encore définir des unités d'éradication.

Un autre champ d'application tout aussi intéressant, la « génétique toxicologique » s'intéresse à caractériser les effets des pesticides et des polluants sur les populations (Belfiore & Anderson 2001). Ces analyses permettent d'étudier les adaptations locales en lien avec la matrice paysagère ainsi que leur maintien grâce aux migrations. Elles peuvent ainsi permettre d'évaluer la transmission de caractères particuliers, tels que la résistance aux pesticides dans le contexte d'une lutte chimique.

La génétique des populations est ainsi un outil d'aide à la décision avant d'élaborer une stratégie de lutte. Elle peut également permettre d'évaluer l'efficacité d'une lutte anti-nuisibles en temps réel pour mieux l'adapter.

#### **I.4. TOXICOLOGIE DES ANTICOAGULANTS ANTAGONISTES DE LA VITAMINE K (AVK)**

Au cours des siècles, plusieurs techniques de lutte anti-rongeurs ont été développées (Encadré 1). La lutte chimique à base d'anticoagulants anti-vitamine K (AVK) est la plus utilisée à travers le monde. Ces raticides provoquent des hémorragies létales quelques jours après ingestion. Cela permet d'éviter l'apparition de résistances comportementales (i.e. refus de consommation d'appâts) (Brunton *et al.* 1993). Les rongeurs possèdent des capacités cognitives développées : ils seraient capables d'associer le décès des congénères avec la consommation d'un pesticide à action immédiate.

Les anticoagulants AVK sont utilisés pour lutter contre les rongeurs, mais également pour la prévention et le traitement des maladies thromboemboliques chez l'homme. Ils inhibent le processus de coagulation sanguine et provoquent une mort par hémorragies. Ils agissent en bloquant le mécanisme de régénération de la vitamine K, molécule essentielle à la synthèse de facteurs de coagulation, d'où leur nom « d'anti-vitamine K ». L'enzyme cible des AVK est la VKOR (vitamine K epoxyde réductase) qui est responsable de la régénération de vitamine K.

Pour comprendre son mécanisme d'action, il est important de comprendre le phénomène de coagulation sanguine dont les AVK sont antagonistes.

#### La lutte biologique

La lutte biologique consiste d'une part à introduire un prédateur naturel du nuisible, tel que la chouette effraie *Tyto alba* (Puan *et al.* 2012 ; Duckett 1976).

D'autre part, il peut s'agir d'utiliser un parasite naturel de l'espèce cible à une concentration létale. C'est le cas de *Sarcocystis singaporensis*, protozoaire originaire du sud-est asiatique dont l'hôte définitif est le python (*Python reticulatus*) et l'hôte intermédiaire du genre *Rattus* ou *Bandicota*. Normalement asymptomatique pour ses hôtes, il provoque une pneumonie létale chez les rats à forte concentration (Jakel *et al.* 2006). Naturellement présent à faible doses, des études sont nécessaires pour connaître son impact à fortes doses sur l'environnement et l'homme.

#### La lutte physique

La lutte physique, ou mécanique, concerne principalement l'utilisation de pièges. Récemment le TBS (Trap-Barrier Systems), un système de barrière en plastiques agrémentées de pièges, a prouvé son efficacité dans les rizières (Aplin *et al.* 2003 ; Singleton *et al.* 2003). La fumigation ou l'inondation des terriers, et la chasse massive sont également utilisées.

#### La lutte chimique

La lutte chimique contient un large spectre de poisons. Les pesticides sous forme d'appâts contiennent une matière active létale après ingestion. L'utilisation de raticides à base d'anticoagulant est aujourd'hui la méthode la plus largement répandue dans le monde. Cependant, d'autres raticides moins chers, tel que le phosphore de zinc (Leung 2007), sont encore utilisés. Des pesticides alternatifs (*e.g.* insecticides à base d'organophosphates ou d'endosulfan) sont utilisés lorsque les raticides légaux sont difficiles à trouver ou trop onéreux pour les fermiers. Il existe aussi des vaccins immuno-contraceptifs spécifiques de l'espèce cible qui consistent à infecter les animaux avec des protéines reproductrices générant une réponse immunitaire qui interrompt la fertilisation. Des simulations sur des populations de souris en milieu agricole montrent que l'application des vaccins immuno-contraceptifs sur deux tiers des femelles fertiles permet d'éviter les pullulations (Chambers *et al.* 1999).

### **Encadré 1. Techniques de luttes anti-rongeurs**

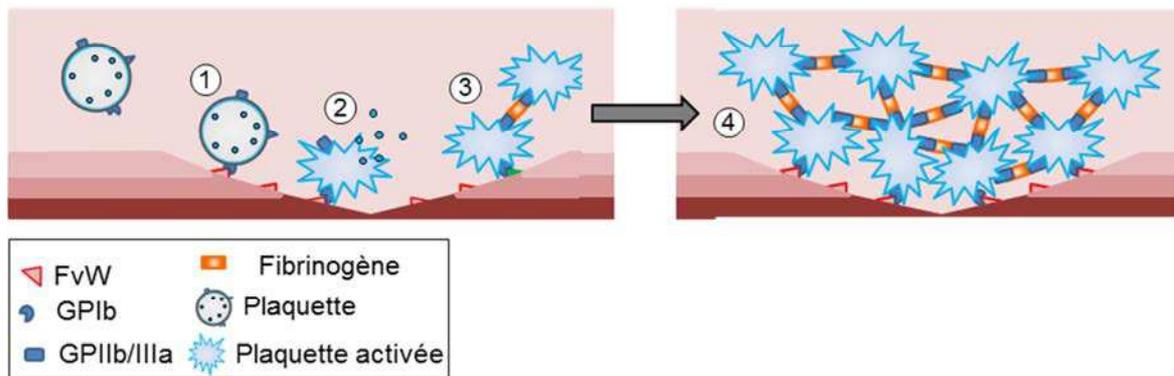
#### **I.4.1. PHYSIOLOGIE DE LA COAGULATION SANGUINE**

La coagulation sanguine, ou hémostasie, est un processus physiologique qui permet de maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux. Lors d'une lésion vasculaire, une vasoconstriction localisée au niveau de la lésion permet de réduire le flux sanguin et de favoriser le processus d'hémostasie en modifiant les conditions hémodynamiques. Trois étapes sont initiées simultanément lorsque la structure interne de l'endothélium (i.e. paroi du vaisseau sanguin) est en contact avec le sang : l'hémostasie primaire, l'hémostasie secondaire, et la fibrinolyse. L'ensemble de ces réactions est régulé par des mécanismes d'auto-amplification et d'inhibition, qui permettent le maintien de l'équilibre hémostatique et la localisation de ce processus au niveau de la lésion vasculaire le temps de la réparation de la paroi du vaisseau. La rupture de l'équilibre hémostatique provoque une thrombose (excès de coagulation) ou une hémorragie (déficit de coagulation).

La lésion vasculaire met en présence le matériel plasmatique avec la structure interne de la paroi vasculaire, dont certaines molécules réagissent avec les acteurs cellulaires et moléculaires de l'hémostase qu'elles activent

**L'hémostase primaire** conduit à une obstruction temporaire de la brèche par la formation d'un thrombus blanc localisé au niveau de la lésion vasculaire (Figure 6). Le thrombus blanc est composé d'un agrégat de plaquettes liées les unes aux autres par des molécules de fibrinogène. Dans un premier temps, les plaquettes forment une monocouche cellulaire en adhérant à la structure interne de la paroi vasculaire lésée (sous-endothélium et média) grâce au récepteur membranaire plaquettaire GPIb qui se fixe au facteur von Willebrand et au collagène de l'endothélium ainsi exposés à la lumière endothéliale. Dans un second temps, les plaquettes adhérentes sont activées et libèrent leur contenu vésiculaire (calcium, facteur von Willebrand...) dans le plasma. Cette dégranulation déclenche l'agrégation plaquettaire en attirant des plaquettes circulantes qui se fixent et s'activent sur la première couche de plaquette. Les récepteurs membranaires GPIIb/IIIa des plaquettes subissent une modification conformationnelle qui leur permet de fixer le fibrinogène en présence de calcium. Le fibrinogène sert de liaison entre les plaquettes activées pour former un caillot plaquettaire appelé thrombus blanc.

La membrane des plaquettes contient une double couche de phospholipides répartis de façon asymétrique. Les phospholipides anioniques prédominants à l'intérieur sont externalisés lors de l'activation plaquettaire pour servir de surface de catalyse des réactions de l'hémostase secondaire.



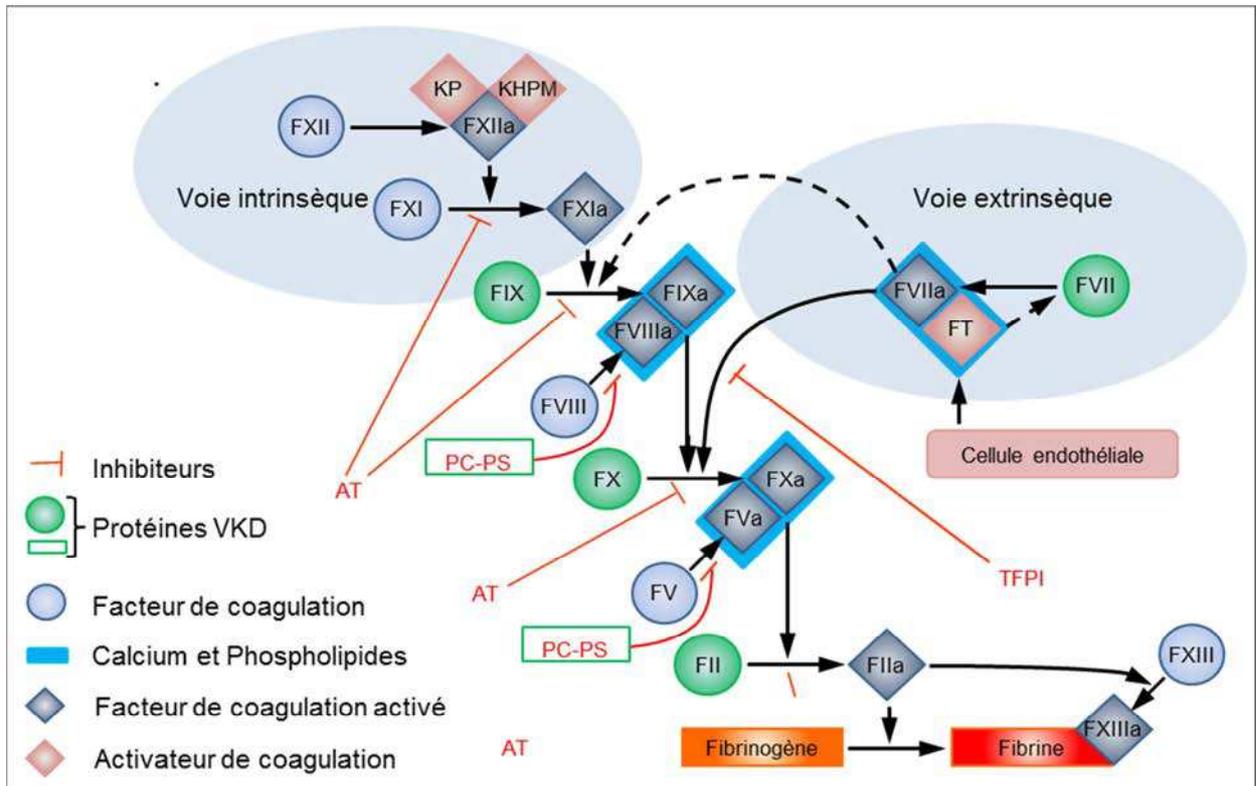
**Figure 6. Hémostase primaire.** L'adhésion des plaquettes sur la surface lésée (1), active la dégranulation (2) et provoque l'aggrégation de plaquettes circulantes (3). L'aggrégation plaquettaire aboutit à la formation d'un amas plaquettaire, le thrombus blanc (4).

**L'hémostase secondaire** est une cascade de réactions enzymatiques qui aboutit à la transformation du fibrinogène de l'agrégat plaquettaire en fibrine insoluble (Figure 7). Ce processus consolide le thrombus blanc en renforçant les liaisons entre les plaquettes, et le prolonge, emprisonnant les globules rouges (thrombus rouge). L'hémostase secondaire fait principalement intervenir des molécules plasmatiques appelées facteurs de coagulation, qui sont des proenzymes synthétisées par le foie. Les facteurs de coagulation circulent sous forme inactive dans le plasma et sont activés au cours du processus de l'hémostase secondaire. Chaque facteur activé peut activer un autre facteur ou modifier certaines protéines impliquées ou non dans la coagulation. Il y a deux voies d'activation de l'hémostase secondaire : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Figure 7).

La voie extrinsèque est initié *in vivo* par le contact entre le facteur de coagulation proconvertine (FVII) et le facteur tissulaire (FT), récepteur membranaire exprimé au niveau des cellules musculaires lisses et des fibroblastes de la paroi vasculaire. Le FT est exposé à la lumière endothéliale lors d'une lésion vasculaire. Il active et fixe le FVII en présence d'ions calcium. Le complexe ainsi formé (FT-FVIIa) est capable d'activer le FVII dans une réaction d'auto-activation. Quand le FT est en excès, le complexe FT-FVIIa active directement le facteur Stuart (FX). Cette voie peut être rapidement inhibée par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI). Le complexe FT-FVIIa active aussi le facteur anti-hémophilique B

(FIX) quand le FT est peu présent ou l'inhibition par le TFPI prépondérante. En présence d'ions calcium et des phospholipides anioniques de la surface des plaquettes activées, le FIX activé forme un complexe équimoléculaire avec son cofacteur, le facteur anti-hémophilique A (FVIII). Le complexe ténase (FIXa-FVIIIa) active ensuite le FX en FXa. L'activation du FX peut donc se faire par le complexe FVII-FT ou par le complexe ténase lorsque peu de facteurs tissulaires sont exposés dans la lumière endothéliale. Le FXa interagit avec la proaccéléline (FV) en présence d'ions calcium et des phospholipides anioniques de la surface plaquettaire, pour former le complexe prothrombinase (FXa-FVa). Ce complexe active la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). La thrombine est une enzyme très puissante, dont le principal substrat est le fibrinogène soluble qu'elle transforme en monomères de fibrine insolubles. La thrombine active également le stabilisant de la fibrine (FXIII) qui crée des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine. De plus, la thrombine catalyse sa propre formation en activant le FXI et les cofacteurs FVIII et FV.

La voie intrinsèque ne fait pas intervenir de facteur extérieur comme le facteur tissulaire, elle est initiée *in vitro* par un système de contact entre le facteur Hageman (FXII), le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) aux surfaces électronégatives du sous-endothélium. Le FXIIa transforme la prékallicréine (PK) en kallicréine qui active le FXII (boucle d'auto-amplification). Le FXIIa active également le facteur Rosenthal (FXI) par protéolyse, qui active ensuite le FIX en présence de calcium. Puis, le processus d'activation enzymatique continue comme dans la voie extrinsèque décrite précédemment.



**Figure 7. Hémostase secondaire.** Cascade enzymatique qui consiste en l'activation successive de facteurs de coagulation. Les complexes (FT-FVIIa), ténase (FVIIIa-FIXa), prothrombinase (FVa-FXa) nécessitent la surface catalytique plaquettaire (PL et Ca<sup>2+</sup>) pour être actifs.

Plusieurs mécanismes régulent le processus de la coagulation et limitent son extension au reste du vaisseau : le **mécanisme d'inhibition et la fibrinolyse**.

Il existe des inhibiteurs pour l'activation de chacun des facteurs de coagulation (Figure 7). L'antithrombine inhibe l'activation de chacun des facteurs de coagulation (Figure 7). L'antithrombine inhibe l'activation des FIIa, FIXa, FXa, FXIa. Le système protéine C - protéine S inhibe l'activation des FVa et FVIIIa. Le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) inhibe l'activation du FX par le complexe FT-FVIIa. Les facteurs de coagulation activés localement sont rapidement dilués dans la circulation où ils vont être inactivés par des inhibiteurs physiologiques de la coagulation.

La dernière étape du processus de coagulation est la fibrinolyse, qui permet la dissolution du caillot de fibrine après réparation tissulaire de la paroi du vaisseau. Cette étape est réalisée par la plasmine, enzyme protéolytique puissante, qui clôture le processus de coagulation. La fibrinolyse permet également de limiter l'extension du caillot dans le reste du vaisseau.

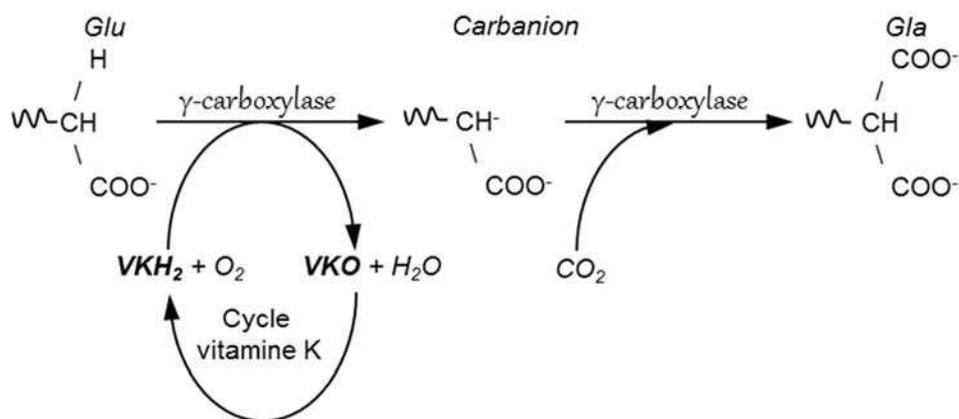
Il y a un équilibre permanent entre les mécanismes de l'hémostase (primaire et secondaire) et les mécanismes régulateurs de l'hémostase (inhibiteurs de l'hémostase et fibrinolyse). Le principe des anticoagulants utilisés pour la lutte anti-rongeurs est de rompre cet équilibre en provoquant un déficit en facteurs de coagulation, indispensables à l'hémostase secondaire.

---

#### I.4.2. FACTEURS VITAMINE K-DEPENDANTS (VKD)

Certains facteurs de la coagulation (FII, FVII, FIX, FX) et certains inhibiteurs de la coagulation (protéine C, protéine S) sont des protéines vitamine K-dépendantes (VKD). Ces molécules nécessitent une modification post-traductionnelle pour être fonctionnelles. Cette modification a lieu dans le foie par l'enzyme gamma-glutamyl-carboxylase (GGCX), et son cofacteur aromatique, la vitamine K (Tie & Stafford 2008). La gamma-carboxylation consiste à modifier les résidus acides glutamiques (Glu) en résidus acide-gamma-carboxyglutamiques (Gla) (Suttie 1985) (Figure 8). Cette modification conformationnelle permet de chélater le calcium pour créer des liaisons aux phospholipides membranaires. Les facteurs de coagulation VKD utilisent les phospholipides membranaires des plaquettes activées, comme surface catalytique. Les molécules non gamma-carboxylées sont donc non fonctionnelles car elles ne pourront pas se fixer aux surfaces plaquettaires pour activer d'autres facteurs procoagulants. Les facteurs non fonctionnels circulent sous forme de PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence) : PIVKA II, PIVKA VII...

La gamma-glutamyl-carboxylase (GGCX) est une glycoprotéine membranaire du réticulum endoplasmique qui modifie les protéines VKD lorsqu'elles sont sécrétées par ce dernier. Cette réaction se déroulerait en deux étapes indépendantes (Dowd *et al.* 1995). La vitamine K hydroquinone (KH<sub>2</sub>) sert de cofacteur pour permettre à la GGCX de soustraire un ion hydrogène du résidu Glu pour former un carbanion. Puis l'ajout d'une molécule de dioxyde de carbone au carbanion intermédiaire produit un résidu Gla (Figure 8). Au cours de cette réaction, la vitamine K hydroquinone (KH<sub>2</sub>) est oxydée en vitamine K époxyde (KO).

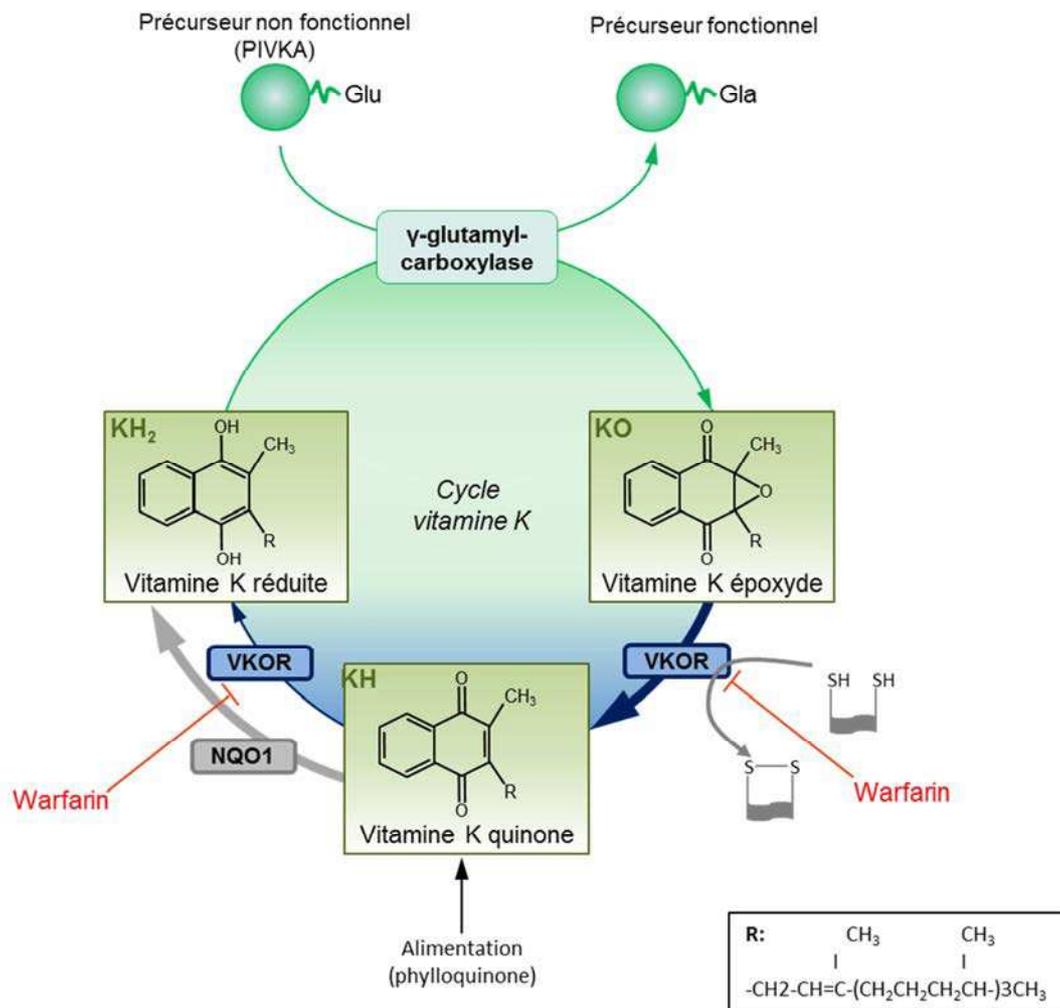


**Figure 8. Mécanisme de réaction de gamma-carboxylation.** La  $\gamma$ -glutamyl-carboxylase convertit des résidus acides glutamiques (Glu) des protéines vitamines K-dépendantes en résidus acides  $\gamma$ -carboxy-glutamique (Gla) par production d'un carbanion et ajout d'un CO<sub>2</sub> au résidu Glu.

La vitamine K étant produite par les cyanobactéries et les organismes photosynthétiques, sa quantité est limitée chez les mammifères car elle dépend surtout des apports alimentaires extérieurs. La vitamine K oxydée doit donc être régénérée en vitamine K réduite pour permettre le maintien des réactions de gamma-carboxylation, et ainsi l'équilibre l'hémostatique. Le cycle de la vitamine K permet cette régénération (Stafford 2005).

#### I.4.3. CYCLE DE LA VITAMINE K

Le cycle de la vitamine K est principalement assuré par une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques, la vitamine K époxyde-réductase (VKOR). La membrane du réticulum endoplasmique étant un environnement cellulaire très oxydant, des auteurs ont proposé un modèle positionnant physiquement la VKOR et la GGCX très proche l'une de l'autre pour protéger la vitamine K réduite jusqu'à la réaction de  $\gamma$ -carboxylation (Wallin & Hutson 2004). Une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, la caluménine serait un régulateur commun de ces deux processus. La caluménine est un inhibiteur de la GGCX (Wajih *et al.* 2004) et module l'activité de VKOR et sa sensibilité aux AVK (Wallin & Hutson 2004).



**Figure 9. Cycle de la vitamine K dans les cellules hépatiques.** La vitamine KO est réduite en KH puis en  $KH_2$  par la VKOR. La VKOR a probablement un partenaire possédant un domaine thiorédoxine (S-S).

Le cycle de la vitamine K comporte deux étapes de réduction (Figure 9). La première étape réduit la vitamine K époxyde (KO) sous forme de vitamine K quinone (KH), puis une deuxième étape réduit la forme quinone (KH) en vitamine K hydroquinone ( $KH_2$ ), cofacteur de la  $\gamma$ -carboxylation. La VKOR est capable de réaliser les deux réactions de réduction successives (Chu *et al.* 2006), mais est principalement impliquée dans la première étape de réduction (KO- $\rightarrow$ KH) (Tie *et al.* 2011). Jusqu'à présent, la deuxième étape de réduction (KH- $\rightarrow$  $KH_2$ ) était supposée être principalement réalisée par une enzyme résistante à la warfarine, la DT-diaphorase ou NAD(P)H-dépendante quinone oxydo-réductase (NQO1) (Wallin & Martin

1987). Récemment, il a été démontré expérimentalement que l'absence de cette enzyme, chez des souris knock-out pour le gène NQO1, ne provoque pas d'hémorragies (Gong *et al.* 2008). Une autre enzyme résistante à la warfarine serait impliquée dans cette réaction (Tie *et al.* 2011).

La VKOR est sensible aux anticoagulants antagonistes de la vitamine K (AVK). Les AVK inhibent l'activité réductase de la VKOR, ce qui interrompt le cycle de régénération de la vitamine K. Cela bloque indirectement la  $\gamma$ -carboxylation des facteurs VKD, et conduit à la production de PIVKA. Le déficit en facteurs de coagulation fonctionnels perturbe l'hémostase secondaire, provoquant des hémorragies pouvant être létales. Les AVK ont un délai d'action car les facteurs de coagulation ont une durée de vie variable. Le délai d'action des AVK est variable suivant leur toxicité (de 1 à 7 jours). On distingue les AVK de première génération, et les AVK de seconde génération, plus toxique.

L'anticoagulant oral le plus étudié est la warfarine, car c'est la molécule la plus utilisée dans le monde.

---

#### I.4.4. MECANISME BIOCHIMIQUE DES AVK

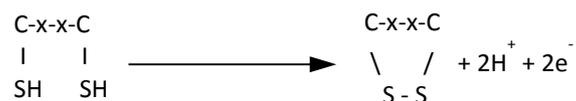
Pour comprendre le mode d'action biochimique des AVK, il est nécessaire de connaître la structure et le fonctionnement de la molécule inhibée, VKOR. Malgré les récentes découvertes sur VKOR, le mécanisme biochimique des AVK n'est pas élucidé.

La récente découverte du gène *vkorc1* (Rost *et al.* 2004 ; Li *et al.* 2004), codant pour la sous-unité principale du complexe enzymatique VKOR, a initié de nombreux travaux de recherche sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la molécule cible de la warfarine. VKORC1 est une protéine transmembranaire de 18 kDa. Elle est localisée sur le réticulum endoplasmique rugueux des cellules hépatiques. Son noyau catalytique est un domaine

transmembranaire (Wajih *et al.* 2005). Il a été démontré que les AVK sont des inhibiteurs non compétitifs de l'activité de la VKORC1 (Lasseur *et al.* 2006).

Chez les mammifères, la VKORC1 possède une paire d'acides aminés cystéines (Cys) en positions 133 et 135, qui correspond à un motif CxxC car elles sont séparées par deux acides aminés variables. Ce motif térapeptide CxxC est supposé être le site actif de la protéine. Chez les mammifères, le site de fixation des AVK se situerait sur le motif TYA aux positions 138-140 de VKORC1, non loin du site catalytique Cys<sub>132</sub> - Cys<sub>135</sub> (Rost *et al.* 2005).

Un résidu cystéine est composé d'une chaîne latérale possédant un atome de soufre (S), qui est sous forme de groupement thiol (SH) à l'état réduit. Dans un motif CxxC, une liaison covalente entre l'atome de soufre (S) de chaque résidu cystéine, forme un pont disulfure (S-S) ou un dithiol (SH-SH). Les échanges dithiols/disulfures permettent de réduire ou d'oxyder les protéines.



La VKORC1 pourrait réduire la vitamine K via ce flux d'électrons et de protons. Le partenaire physiologique rédox de la VKORC1 qui permet des échanges dithiols/disulfures reste incertain. Plusieurs modèles ont été proposés, impliquant une protéine appartenant à la super-famille des thiorédoxines (Schulman *et al.* 2010). La thiorédoxine catalyserait également le repliement tridimensionnel correct de VKORC1, ainsi que l'ouverture (réduction) et la fermeture (oxydation) des ponts disulfures des protéines (activité oxydo-reductase) (Wajih *et al.* 2007). Elle pourrait être de la famille des glutathion-S-transférases (GST) (Cain *et al.* 1997), ou des protéines disulfides isomérases (PDI) (Goodstadt & Ponting 2004).

A ce jour, la structure tridimensionnelle de VKORC1 chez le rat n'a pas été découverte. Des homologues de la VKORC1 humaine existent chez de nombreux groupes d'organismes : vertébrés, invertébrés, plantes, bactéries, archées (Goodstadt & Ponting 2004). Toutes les séquences protéiques analysées par ces auteurs possèdent quatre résidus cystéines et un résidu Sérine/thréonine, qui auraient un rôle fonctionnel. En plus du motif CxxC précédemment

exposé, une paire de cystéines additionnelles en positions 43 et 51 chez l'homme, permettrait les échanges dithiols/disulfures avec la thiorédoxine. Ces échanges permettraient ensuite de réduire le motif Cys<sub>132</sub> - Cys<sub>135</sub> qui a été oxydé par la réaction de réduction de la vitamine K.

Certaines études réalisées avec des algorithmes (Goodstadt & Ponting 2004) et avec une cristallisation de protéine de bactéries (Li *et al.* 2010), suggèrent une structure en quatre domaines transmembranaires, alors que d'autres études *in vitro* suggèrent la présence de trois domaines transmembranaires (Tie *et al.* 2012, Rost *et al.* 2004). La structure cristalline des deux protéines (GGCX et VKOR) n'a pas été caractérisée chez les mammifères, et la compréhension du cycle de la vitamine K à un niveau moléculaire reste partielle.

Récemment, une équipe américaine a réussi à cristalliser la protéine VKORC1 homologue (VKORH) chez une bactérie *Synechococcus sp* (Li *et al.* 2010). VKORH possède cinq domaines transmembranaires (TM). Elle est naturellement fusionnée à son partenaire rédox, qui ressemble à une thiorédoxine. Ces auteurs ont proposé que la VKORC1 des mammifères serait une protéine de quatre domaines TM, possédant une paire de cystéines ancestrales (Cys<sub>43</sub> ; Cys<sub>51</sub>) et une paire de cystéines catalytiques (Cys<sub>132</sub> ; Cys<sub>135</sub>) dans le quatrième domaine TM. Les quatre domaines TM sont des hélices  $\alpha$  reliés par des boucles  $\beta$ . La paire de cystéines ancestrales se situe sur un demi-segment entre les domaines TM1 et TM2. A partir de ce modèle, les auteurs proposent un flux d'électrons, par la formation d'échanges dithiols/disulfures entre le partenaire thiorédoxine et le site catalytique, via les cystéines ancestrales. Cette idée de transfert d'électrons d'un partenaire rédox via les cystéines résiduelles (Cys<sub>43</sub> ; Cys<sub>51</sub>) au site actif CxxC de VKORC1 (Cys<sub>132</sub> ; Cys<sub>135</sub>) a été renforcée par des études *in vitro* de la VKORC1 humaine (Rishavy *et al.* 2010).

Par la suite, des auteurs ont récemment modélisé la VKORC1 de *Rattus norvegicus* en se basant sur la découverte de la structure cristalline de la VKORH réalisée par Li *et al.* (2010) (Mladenovic *et al.* 2012). Cette modélisation a été réalisée de façon à respecter les quatre domaines transmembranaires de VKORH. Mais la modélisation des boucles extra-cellulaires

était incertaine, car la séquence génétique de la VKORH est très différente de la VKORC1 des mammifères.

Plus récemment, une autre équipe américaine a démontré que le rôle fonctionnel des cystéines ancestrales (Cys<sub>43</sub> ; Cys<sub>51</sub>) est indispensables à l'activité de la VKORH, et non pour la VKORC1 humaine (Tie *et al.* 2012). La VKORC1 humaine posséderait donc trois domaines transmembranaires, et aurait un mécanisme d'action différent de la VKORH. Cette équipe propose deux modèles de topologies de VKORC1 humaine : (1) un modèle en trois domaines transmembranaires, avec la région N-terminale dans la lumière du réticulum endoplasmique et la C-terminale dans le cytoplasme ; (2) un modèle en quatre domaines transmembranaires avec les régions N- et C-terminales dans le cytoplasme.

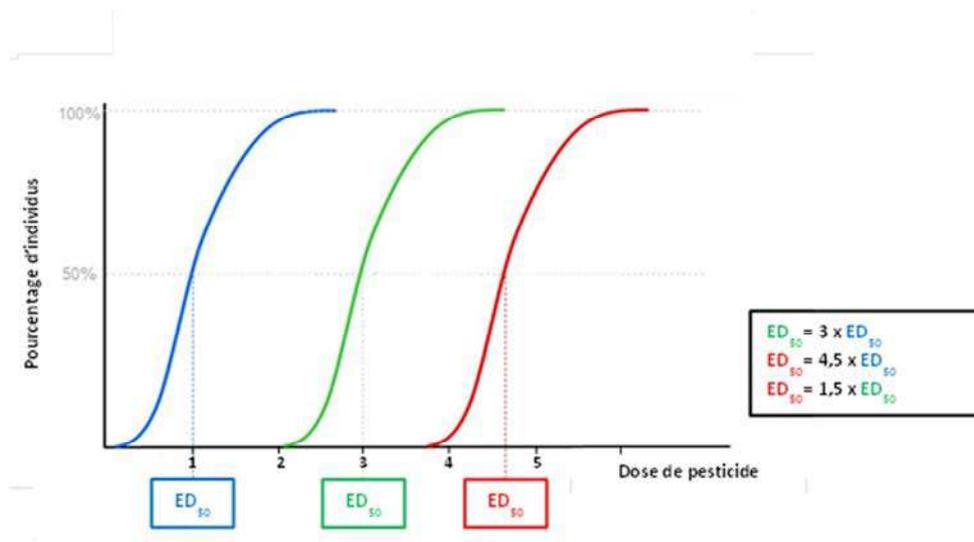
## I.5. CONSEQUENCES BIOLOGIQUES DES ANTICOAGULANT AVK

### I.5.1. RESISTANCE AUX PESTICIDES : UNE ADAPTATION INDUITE PAR LES PRESSIONS ANTHROPIQUES

Les premières observations d'un phénomène de résistance aux anticoagulants AVK ont été reportées chez le rat brun *Rattus norvegicus* dès 1958 (Boyle 1960), quelques années seulement après leurs premières utilisations en Europe dans les années 1950. De même, dans les plantations de palmiers à huile du Sud-Est asiatique, un phénomène de résistance aux anticoagulants AVK a été observé chez le rat asiatique des maisons *Rattus rattus diardii* six à sept ans après le début de traitements systématiques (Wood & Liao 1978). Chez l'homme, l'observation de phénotypes « hypersensible » et « résistant » au traitement aux AVK pour les maladies thrombo-emboliques est un problème pour la survie des patients. La compréhension des mécanismes de résistance anticoagulants AVK est primordiale pour appréhender la variabilité de réponses à ces molécules.

On appelle résistance aux pesticides, un caractère phénotypique décrivant une capacité à tolérer des doses létales de substances toxiques. Le degré de résistance d'une population est

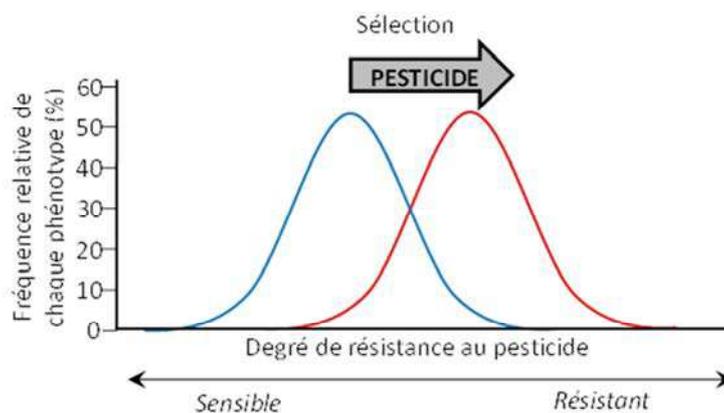
évalué en fonction de la dose létale (LD50) ou de la dose efficace (ED50) d'une population sensible. La LD50 est la dose létale pour 50% des individus de la population, et l'ED50 est la dose efficace pour laquelle 50% des individus de la population répondent positivement au pesticide. Le degré de résistance correspond donc à un facteur de la LD50 ou de l'ED50 de référence (Figure 12).



**Figure 12. Comparaison de la dose efficace pour trois populations théoriques.** La population sensible, dite de référence, est représentée en bleu. Les deux autres courbes représentent des populations résistantes, avec un degré de résistance supérieur pour la population rouge ( $ED_{50} = 1,5 \times ED_{50}$ ).

La résistance aux pesticides est souvent monogénique ou oligogénique. Cela signifie qu'un ou très peu de gènes suffisent à expliquer les phénomènes de résistance. Ces gènes codent pour les molécules cibles ou pour les enzymes du métabolisme. Le caractère génétique d'une résistance permet son héritabilité, c'est-à-dire sa transmission aux descendants. Dans ce cas, l'utilisation de pesticide exerce une pression de sélection en faveur des individus au génotype « résistant » et au détriment des individus au génotype « sensible ». A terme, l'effet délétère des pesticides sur les allèles sensibles peut conduire à la fixation des allèles résistants au sein d'une population. Il existe généralement un coût adaptatif à la résistance qui agit négativement sur la fitness des individus. En présence de pesticide, la valeur sélective des génotypes « résistants » est supérieure à celle des génotypes « sensibles » (Figure 13). La résistance aux pesticides pourrait être décrite comme un phénomène d'adaptation rapide des

populations à une pression abiotique. Un pesticide exercerait une pression de sélection « non naturelle » sur les organismes, permettant d'améliorer la fitness des individus résistants.



**Figure 13. Exemple de sélection directionnelle du phénotype « résistance aux pesticides ».** Le schéma représente une population sensible (courbe bleue) qui devient résistante (courbe rouge) sous la pression de sélection exercée par les pesticides, qui favorise les phénotypes résistants.

Une résistance peut être caractérisée à un niveau phénotypique (e.g. physiologique, métabolique) ou génétique. Le phénotype étant le résultat visible du génotype.

Le test BCR (Blood Clotting Response) est l'approche phénotypique classique pour mesurer le degré de résistance d'un rongeur aux AVK. Ce test a été standardisé pour différents AVK sur une lignée de rats bruns *Rattus norvegicus* sensibles, par le groupe de travail RRAC (Rodenticide Resistance Action Committee) de CropLife international (Prescott 2003). Il consiste à mesurer le temps de coagulation sanguine d'un rongeur après exposition aux anticoagulants AVK. Le temps de coagulation mesuré équivaut à une réponse phénotypique traduisant la sensibilité de l'individu à l'AVK. Une augmentation du temps de coagulation traduit une réponse positive et une sensibilité à l'AVK, alors qu'un temps de coagulation normal traduit une tolérance à l'AVK (i.e. pas d'effet de l'AVK). Cette technique permet d'une part de mesurer la résistance d'un rongeur, et d'autre part de calculer une dose efficace pour laquelle 50% des individus répondent positivement à l'AVK ( $ED_{50}$ ) pour l'ensemble d'une population.

Le temps de coagulation mesuré par cette méthode correspond au temps de Quick ou taux de prothombine, ce qui équivaut à explorer la voie extrinsèque de la coagulation.

Plusieurs facteurs peuvent moduler l'effet des anticoagulants AVK sur les individus. les facteurs démographiques (sexe, âge, IMC, comorbidité), les facteurs environnementaux (alimentation, médicaments), et les facteurs génétiques (polymorphisme génétique de l'enzyme cible VKOR et des enzymes de détoxification CYP450). Chez l'homme, les mutations de *vkorc1* (gène de VKOR) et de *cyp2c9* (gène d'un CYP450) permettent d'expliquer 30 à 40% de la variabilité individuelle (Siguret *et al.* 2007).

---

#### I.5.2. MUTATIONS DE LA MOLECULE CIBLE (VKORC1)

Des mutations du gène de l'enzyme cible peuvent entraîner des modifications structurales voire fonctionnelles de la molécule. Ces modifications peuvent être à l'origine de mécanismes de résistance, par exemple en réduisant l'affinité de la cible pour le pesticide.

Le gène impliqué dans la résistance aux AVK a tout d'abord été localisé chez le rat *rattus norvegicus*, sur le chromosome 1 près du microsatellite D1rat219 par une méthode LD (Kohn *et al.* 2000). A partir de ce travail, le gène codant pour l'enzyme cible des anticoagulants, VKORC1 (sous-unité 1 du complexe Vitamine K epoxide-reductase), a pu être identifié chez cette espèce en 2004 (Rost *et al.* 2004). VKORC1 est la sous-unité principale du complexe VKOR. Les gènes orthologues chez l'homme, *homo sapiens*, et la souris des maisons, *mus musculus*, sont respectivement localisés sur les chromosomes 16 et 7. Composé de trois exons, le gène *vkorc1* code pour une protéine 18 kDa composée de 161 acides aminés chez le rat et la souris, et de 163 acides aminés chez l'homme.

La première mutation ponctuelle (SNP ; Single Nucleotide Polymorphism) identifiée sur ce gène est une mutation faux-sens qui a pour conséquence la substitution d'une tyrosine par une phénylalanine en position 139 (Rost *et al.* 2004). Cette mutation Y139F confère à elle seule une résistance aux anticoagulants AVK chez *Rattus norvegicus* (Grandemange *et al.* 2009). Elle est localisée proche du site catalytique de l'enzyme, et pourrait ainsi diminuer l'affinité

de VKORC1 pour l'AVK ou augmenter l'affinité de VKORC1 pour la vitamine K. Cette mutation Y139F est très présente chez les rats bruns sauvages en Europe, et constituerait une des bases principales de la résistance des rongeurs aux anticoagulants (Pelz *et al.* 2005, Grandemange *et al.* 2010).

D'autres mutations de résistance aux AVK ont été identifiées dans le gène *vkorc1* des rats bruns sauvages, et sont répertoriées dans le tableau 1. Jusqu'à présent, vingt-et-une mutations de *vkorc1* ont été identifiées en Europe et à travers le monde chez des rats sauvages (Grandemange *et al.* 2010, Pelz *et al.* 2005, Rost *et al.* 2009). Ces mutations ont été identifiées chez des rats dont la résistance phénotypique est avérée ou suspectée (i.e. rat provenant d'une zone traitée aux AVK). Dix-huit d'entre elles ont été caractérisées *in vitro*. La caractérisation *in vitro* consiste à mesurer l'effet des AVK sur l'activité basale des enzymes VKOR purifiées, à partir de fractions microsomales hépatiques de rats ou à partir de cellules recombinantes. Parmi ces mutations caractérisées *in vitro*, sept ont été répertoriées chez des rats au phénotype « résistant » (Pelz *et al.* 2005) et onze autres chez des rats dont le phénotype n'a pas été testé mais qui proviennent de zones traitées aux AVK (Rost *et al.* 2009).

Code	Substitution acide aminé	Origine
A21T	Ala21Thr	Corée <sup>b</sup>
A26T	Ala26Thr	Angleterre <sup>b</sup>
A33P	Arg33Pro	Angleterre <sup>b</sup>
A35P	Arg35Pro	France <sup>a</sup> , USA (Chicago) <sup>b</sup>
Y39N	Tyr39Asn	Angleterre <sup>b</sup>
S56P	Ser56Pro	Allemagne <sup>a</sup>
W59R	Trp59Arg	Argentine <sup>b</sup>
F63C	Phe63Cys	Angleterre <sup>b</sup>
E67K	Glu67Lys	Japon <sup>b</sup>
I90L	Ile90Leu	Açores <sup>b</sup> , Argentine <sup>b</sup> , Indonésie <sup>b</sup> , USA <sup>b</sup>
S103Y	Ser103Tyr	France <sup>c</sup>
V112L	Val112Leu	Açores <sup>b</sup>
L120Q	Leu120Gln	Angleterre <sup>a</sup> , France <sup>c</sup>
L128Q	Leu128Gln	Angleterre <sup>ab</sup> , France <sup>c</sup>
L128S	Leu128Ser	France <sup>c</sup>
Y139C	Tyr139Cys	Allemagne <sup>a</sup> , Angleterre <sup>ab</sup> , Danemark <sup>a</sup> , Hongrie <sup>b</sup> , France <sup>c</sup>
Y139F	Tyr139Phe	Belgique <sup>a</sup> , Corée <sup>b</sup> , France <sup>ac</sup>
Y139S	Tyr139Ser	Angleterre <sup>ab</sup>
I141V	Ile141Val	Indonésie <sup>b</sup>
A143V	Ala143Val	Indonésie <sup>b</sup>
E155K	Glu155Lys	France <sup>c</sup>

**Tableau 1. Mutations faux-sens de VKORC1 recensées chez le rat brun, *Rattus norvegicus*, sauvage.** <sup>a</sup> d'après Pelz *et al.* 2005, dont la résistance phénotypique est confirmée ; <sup>b</sup> d'après Rost *et al.* 2009, dont la résistance phénotypique est suspectée ; <sup>c</sup> d'après Grandemange *et al.* 2010, dont la résistance phénotypique est suspectée

Les codons 128 et 139 de *vkorc1* semblent représenter des « hotspots » pour les mutations de résistance aux AVK, puisque différents variants (Y139F, Y139C, Y139S ; L128Q, L128S, L128R) sont présents chez le rat brun, la souris des maisons et l'homme (Pelz *et al.* 2005).

Les mutations I90L et A43V sont présentes dans les gènes orthologues sauvages (i.e. non mutés) d'autres espèces. Ces deux mutations sont fonctionnellement conservatrices, car la

substitution d'un acide aminé par un autre chimiquement similaire n'affecte pas profondément la fonction de la protéine. L'activité de VKORC1 engendrée par les mutations I90L et A143V est respectivement similaire et plus importante que l'activité de VKORC1 non muté (Rost *et al.* 2009).

Les études *in vitro* montrent que quasiment toutes ces mutations diminuent considérablement l'activité enzymatique basale de VKORC1 (Pelz *et al.* 2005, Rost *et al.* 2009, Rost *et al.* 2004). L'activité des enzymes mutées est partiellement inhibée par les AVK avec une sensibilité variable selon le type d'AVK. Certains variants s'avèrent fonctionnellement neutres ou conservateurs, mais d'autres semblent responsables de la résistance aux AVK chez le rat et l'homme ainsi que de maladies hémorragiques, telles que le déficit de facteur de coagulation de type 2 vitamine K-dépendant (VKCFD2), chez l'homme (Rost *et al.* 2004).

Bien que le mécanisme d'inhibition et le site de fixation des AVK n'ait pas été confirmé, la plupart des mutations de résistance chez l'homme et le rat sont colocalisées (Li *et al.* 2010).

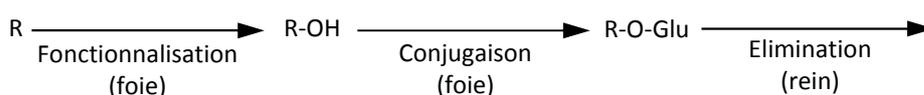
Une étude suggère que les mutations de *vkorc1* constituent la base génétique de la résistance aux anticoagulants chez les rongeurs sauvages et que la résistance est transmise comme un trait autosomal dominant. (Pelz *et al.* 2005). Depuis quelques années, le gène *vkorc1* est ainsi considéré comme un marqueur diagnostique de la résistance phénotypique aux anticoagulants chez le rat. Cet outil diagnostique est utilisé entre autre pour cartographier et identifier les différentes mutations SNP caractérisant la résistance des rongeurs sauvages aux anticoagulants (Baert *et al.* 2012 ; Grandemange *et al.* 2010 ; Pelz *et al.* *et al.* 2005). Une fois les SNP identifiés, leur rôle dans la résistance peut être étudié *in vitro* (e.g. cinétique enzymatique, expression d'ARN), et la prévalence de la résistance peut ainsi être évaluée et caractérisée au sein des populations sauvages.

Bien que certains mécanismes de résistance aux AVK s'expliquent par une transmission héréditaire des mutations de *vkorc1*, d'autres mécanismes ne semblent pas associés au polymorphisme de ce gène (Heiberg 2009). D'autres formes de résistance aux AVK, notamment la résistance aux AVK de seconde génération et la résistance chez d'autres espèces, impliqueraient d'autres gènes. Du fait de son hérédité instable, une résistance

multigénique a été suggérée chez le rat noir, *Rattus rattus* (Greaves *et al.* 1976). Certaines études ont mis en évidence des mutations dans le promoteur et la région intronique de *vkorc1* chez l'homme, qui modifient l'expression de la molécule et induit un phénomène de résistance (Yuan *et al.* 2005, D'andrea *et al.* 2005). D'autres études ont mis en évidence l'importance du polymorphisme des enzymes de détoxification des AVK dans les processus de résistance.

### I.5.3. MUTATIONS DES ENZYMES DU METABOLISME (CYP450)

Les AVK sont des substances toxiques qui sont métabolisées par le foie avant d'être éliminées par l'organisme (excrétion par les selles et les urines). La voie du métabolisme des xénobiotiques (e.g. médicaments, pesticides) permet de transformer des substances toxiques en métabolites inactifs. Elle est composée de deux phases complémentaires, la fonctionnalisation et la conjugaison. La fonctionnalisation consiste à transformer par hydroxylation les substances toxiques (R) en métabolites intermédiaires (R-OH). Le caractère électrophile de ces métabolites intermédiaires permet la seconde transformation de conjugaison, par exemple par glucuronidation (R-O-Glu), puis leur élimination de l'organisme.

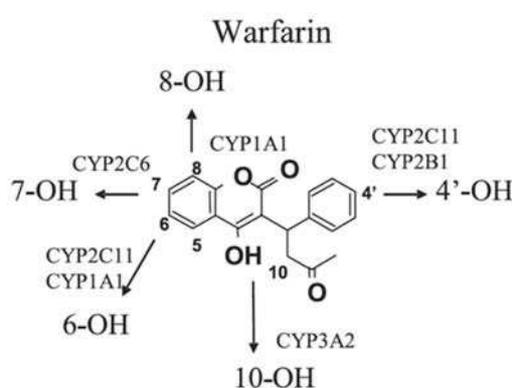


La fonctionnalisation est essentiellement catalysée par une superfamille enzymatique : les cytochromes P450 (CYP450). Les CYP450 sont des hémoprotéine transmembranaires localisées dans le réticulum endoplasmique lisse du foie. Ce sont également des mono-oxygénases qui oxydent les xénobiotiques. Leur polymorphisme peut moduler leur fonction et être responsable de mécanisme de résistance.

Ainsi, le polymorphisme des CYP450 peut moduler la sensibilité aux anticoagulants AVK en accélérant le processus de détoxification. L'efficacité de ce processus d'élimination accéléré

peut être mis en évidence en mesurant la concentration plasmatique de l'AVK quelques temps après son ingestion. La clairance plasmatique, correspond à la vitesse d'élimination du xénobiotique dans le sang.

Plusieurs isoformes de CYP450 sont connues pour métaboliser les AVK (Daly *et al.* 2003) (Figure 15). Chez l'homme, le CYP450 2C9 (i.e. CYP2C9) contribue à 80% du métabolisme de la S-Warfarine. Le polymorphisme de CYP2C9 chez l'homme module la sensibilité aux AVK.



**Figure 15. Voies métaboliques de la warfarine dans le foie chez un rat mâle** d'après Ishizuka *et al.* (2008). La warfarine est un substrat des CYP450 pouvant être hydroxylé par les différentes sous-familles CYP1A, CYP2B, CYP2C et CYP3A.

Chez les rats, l'hydroxylation des AVK semble principalement catalysée par les sous-familles CYP1A, CYP2C, CYP2B, et CYP3A (Ishizuka *et al.* 2008). Les cinq métabolites identifiés sont les hydroxydes 4'-, 6-, 7-, 8- ou 10-OH (Guengerich *et al.* 1982). Ces métabolites sont ensuite rendus hydrosolubles par glucoronidation (phase de conjugaison) puis excrétés par les urines, comme dans la voie métabolique chez l'homme. A ce jour 108 gènes cyp450 ont été identifiées dans le génome du rat (Nelson *et al.* 2009), et l'identité des CYP450 impliqués dans le métabolisme des AVK n'ont pas tous été identifiés.

La surexpression de certaines de ces enzymes a été démontrée chez deux espèces de rongeurs résistants aux AVK : chez le rat brun *Rattus norvegicus* exposé aux anticoagulants de seconde génération (Markussen *et al.* 2007), et chez le rat noir *Rattus rattus* exposé aux AVK de première génération (Ishizuka *et al.* 2007).

Des études ont été menées chez des rats bruns résistant aux AVK avec un génotype homozygote Y139F. Ces études montrent qu'une exposition à la bromadiolone, AVK de seconde génération, induit une sur-expression des gènes codant pour les cytochromes P450 CYP2E1, CYP3A2 et CYP3A3 chez les rats au phénotype « résistant » par rapport aux rats au phénotype « sensible ». De plus, la modulation de cette expression (sur- et sous-expression) varie en fonction de l'âge et du sexe (Markussen *et al.* 2007 ; Markussen *et al.* 2008).

Une autre étude a été réalisée chez le rat noir « résistant » à la warfarine (Ishizuka *et al.* 2007). Cette étude a mis en évidence une clairance plus rapide de la warfarine chez les rats résistants. Exposés à la warfarine, les rats résistants montrent une activité d'hydroxylation de la warfarine et une expression du CYP3A2 significativement plus importantes que chez les rats sensibles. De plus l'administration d'inhibiteurs des CYP450 augmente la mortalité chez les rats résistants. Le mécanisme de résistance aux AVK de cette lignée de rats noirs *Rattus rattus* semble résider dans la voie métabolique.

---

#### I.5.4. COUT BIOLOGIQUE ET INTOXICATION SECONDAIRE

En générale, les mutations conférant une résistance aux pesticides ont un **coût biologique**, c'est-à-dire un désavantage à la fitness (Coustau *et al.* 2000 ; Andersson 2006).

Dans le cas de la résistance aux AVK, le polymorphisme de *vkorc1* provoque une réduction de l'activité basale de l'enzyme VKOR, donc une régénération de vitamine K amoindrie. Un allèle muté de *vkorc1* provoquerait une carence en vitamine K et aurait des effets délétères.

En effet, la vitamine K est un cofacteur indispensable à la synthèse de protéines vitamine K-dépendantes impliquées dans différents processus physiologiques, tels que la coagulation sanguine et la croissance osseuse (e.g. protéine Gla, ostéocalcine) (Berkner 2005). Jusqu'à présent, aucun coût à la résistance aux AVK n'a été confirmé chez les rongeurs, bien que plusieurs effets délétères aient été observés :

- Des hémorragies spontanées ont été observées des rats bruns homozygotes résistant (Martin *et al.* 1979).

- Une minéralisation de l'aorte est favorisée chez les rats bruns homozygotes pour la mutation Tyr139Cys de *vkorc1* (Kohn *et al.* 2008).
- L'ostéocalcine est une protéine vitamine K-dépendante indispensable à la fixation du calcium sur les os. Le coût d'une résistance aux AVK liée à un faible rendement du cycle de la vitamine K pourrait être un phénomène d'ostéoporose.
- En absence d'AVK, les femelles modérément résistantes sont de meilleures reproductrices que les femelles très résistantes chez le rat brun (Heiberg *et al.* 2006).
- Les AVK inhibent également la VKORC1-like1 (VKORC1L1), une isoforme de la VKORC1, impliquée dans l'élimination des formes réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) générées pendant le processus rédox de VKORC1 (Schaafhausen *et al.* 2011 ; Westhofen *et al.* 2011). La présence de ROS dans les cellules est responsable de stress oxydatif qui peut provoquer la mort cellulaire.
- Il est envisagé que les rongeurs résistants soient plus porteurs de zoonoses que les rongeurs sensibles (Runge *et al.* 2012).
- Les protéines VKORC1 et VKORC1L1 sont largement distribués dans les tissus de l'organisme, tels que les reins, la rate, les poumons (Czogalla *et al.* 2009). Il est suggéré que l'ensemble de leurs fonctions et des protéines vitamine-K-dépendantes n'a pas été découvert.

Un apport extérieur en vitamine K permet de rétablir le processus de coagulation sanguine chez les rats bruns résistants (Markussen *et al.* 2003). Cependant, il est difficile d'affirmer que les rongeurs résistants supplémentent leur alimentation en vitamine K dans leur milieu naturel. Il est par contre envisageable que la faible activité de VKORC1 chez les rats résistants ait stimulé d'autres voies régulatrices impliquées dans la supplémentation en vitamine K et qu'un mécanisme compensatoire se soit développé chez ces rongeurs. Ce mécanisme permettrait le maintien de cet allèle dans des populations non soumise aux pressions AVK. Cela augmenterait la difficulté de gestion des populations de rongeurs.

L'apparition de phénomènes de résistance chez les rongeurs a conduit à la synthèse et l'utilisation de molécules AVK de « seconde génération » plus toxiques. Au niveau de

l'environnement, l'utilisation des AVK a parfois des conséquences pour les organismes non ciblés. D'autres espèces sont susceptibles de consommer directement les appâts ou les rongeurs intoxiqués. Les AVK sont stockés dans le foie des rongeurs avec des temps de rémanence assez longs. Plusieurs cas **d'intoxications secondaires** ont été rapportés, avec des conséquences plus ou moins importantes pour les populations concernées (Fisher *et al.* 2004 ; O'connor *et al.* 2003). Ce phénomène soulève l'importance d'une lutte ciblée pour éviter les dommages collatéraux sur l'environnement.

## I.6. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

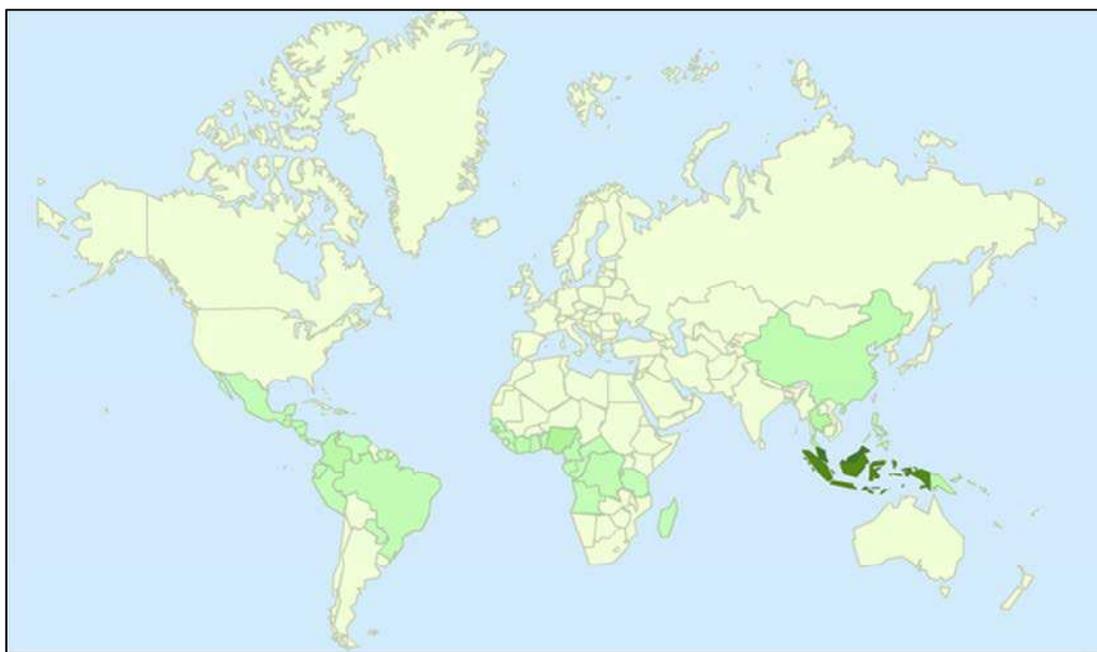
La présente étude se situe dans les plantations de palmiers à huile, un agro-écosystème de grande échelle, où la gestion des populations invasives de rongeurs constitue un enjeu économique et écologique majeur.

### I.6.1. CONTEXTE D'ETUDE : LES PLANTATIONS DE PALMIERS A HUILE

Les plantations de palmiers à huile, *Elaeis guineensis*, sont en rapide expansion depuis les années 1970 dans le sud-est asiatique (Carter *et al.* 2007; Corley & Tinker 2003). Les palmiers à huile ont un rendement et des revenus élevés.

Avec un rendement moyen de quatre tonnes d'huile par hectare, et atteignant parfois huit tonnes d'huile par hectare, le rendement en huile de cette espèce végétale est supérieur à celui des autres espèces oléagineuses. Les palmiers à huile ont un rendement jusqu'à dix fois supérieur à celui du soja et quatre fois supérieur à celui du colza, et des coûts de production les moins élevés des huiles végétales, inférieurs de 20 % à ceux du soja et bien inférieurs à ceux du colza (Thoenes 2006). Les noix de palme, fruits du palmier à huile, produisent deux types d'huiles utilisées dans l'agroalimentaire et l'oléochimie : l'huile de palme est issue de la pulpe et l'huile de palmiste est issue de l'amande. Cette rentabilité élevée a conduit à l'expansion rapide et à grande échelle de ce système agricole dans le sud-est asiatique.

L'Indonésie et la Malaisie représentent 90% de la production et du marché mondial d'huile de palme (Figure 16). L'Indonésie est aujourd'hui le premier producteur mondial avec plus de 19 millions de tonnes d'huile produite pour l'année 2010 et près de huit millions d'hectares alloués à cette production (Ministry of Agriculture of Indonesia 2009 dans Rist *et al.* 2010). Cette production est partagée entre les grandes entreprises et les petits producteurs, qui occupent 35 à 40 % des surfaces plantées en palmiers pour 33 % de la production (Vermeulen & Goad 2006). Ces plantations sont des monocultures intensives qui s'étendent sur des milliers d'hectares, voire des dizaines de milliers d'hectares dans certaines régions. La surface occupée par les plantations de palmiers à huile en Indonésie a augmenté de 103% entre 2001 et 2008.



**Figure 16. Quantités moyennes de production d'huile de palme** en tonnes par pays de 1992 à 2010. La couleur vert foncé correspond à l'Indonésie et la Malaisie. Les données ont été générées sur le site web FaoStat (<http://faostat3.fao.org>)

Comme chaque espèce agricole, le palmier à huile possède ses parasites (e.g. *Limacodidae*), ses maladies (e.g. *Ganoderma*) et ses ravageurs. Les rats sont les principaux mammifères ravageurs des noix de palmes. Ils constituent des populations invasives de 100 à 600

individus/hectare dans les palmeraies (Wood & Fee 2003), et sont à l'origine de dégâts importants : 5 à 10% de perte de production d'huile (Wood & Fee 2003, Liau 1990).

---

#### I.6.2. MODELE D'ETUDE : LES RONGEURS

Dans les jeunes palmeraies les rongeurs provoquent des dégâts sur les parties végétatives des jeunes plants, pouvant nécessiter leur remplacement. En palmeraies matures, les dégâts sont concentrés directement sur les fruits, et indirectement sur les inflorescences mâles où les rongeurs se nourrissent des larves des insectes pollinisateurs (Wood 1982). Dans les palmeraies matures, le régime alimentaire de ces rongeurs est composé à 96% de noix de palme (Liau 1990 ; Wood & Liau 1984). Ils nichent au sommet des palmiers et au sol, sous les tas de frondes des palmiers déposés au sol lors de la récolte (Wood & Fee 2003).

Les espèces de rongeurs identifiées dans les palmeraies en Malaisie sont principalement le rat des rizières *Rattus argentiventer* (Robinson & Kloss, 1916), le rat des champs malais *Rattus tiomanicus* (Miller, 1900), et le rat noir asiatique *Rattus R3* (sensu Pagès *et al.* 2010) également nommé *Rattus rattus diardii* (Jentink, 1880) (Wood & Fee 2003).

Le rat des rizières *Rattus argentiventer* est généralement présent dans les pépinières et les jeunes palmeraies. Les deux autres espèces occupent les plantations matures (Wood 1968 ; Wood 1982). C'est une espèce native de l'Indonésie, naturellement présente dans les prairies marécageuses. Elle a aujourd'hui envahi les rizières et les plantations de palmiers à huile (Payne *et al.* 1985).

Le rat des champs malais *Rattus tiomanicus* est présent dans les palmeraies matures. C'est une espèce endémique de l'Indonésie, native du plateau continental de Sunda (Sumatra, Bali, Java, Bornéo, et les îles alentours). Son habitat naturel est composé de milieux arbustifs ou broussailleux, tel que les forêts secondaires et les prairies (Payne *et al.* 1985). Cette espèce arboricole est très agile et très bien adaptée aux plantations de palmiers à huile.

La taxonomie du rat noir asiatique *Rattus R3* est cryptique. Ce clade est très proche de celui du rat asiatique des maisons *Rattus tanezumi* (Temminck, 1844) (Aplin *et al.* 2011 ; Pagès *et al.* 2010). Bien que différenciées par l'analyse de l'ADN mitochondrial (e.g. barcoding), ces deux entités ne peuvent être différenciées par l'analyse des marqueurs nucléaires (e.g. microsatellites) (com. pers. Pagès 2011). Dans ce travail de thèse, les deux entités *Rattus R3* et *Rattus tanezumi* sont considérées dans un clade commun *Rattus tanezumi/R3*. Ce clade est originaire du Sud-Est asiatique, et a probablement été introduit en Indonésie dans le plateau continental de Sunda. C'est un commensal de l'homme et son habitat naturel est probablement la lisière des forêts (Salibay & Luyon 2008 ; Rickart *et al.* 2011). Il a été observé dans les palmeraies à partir des années 1980 et devient de plus en plus fréquent (Wood & Fee 2003 ; Basri & Halim 1985 dans Hafidzi & Saayon 2001).

*Rattus tiomanicus* est l'espèce dominante des palmeraies matures (Wood & Fee 2003 ; Hafidzi & Saayon 2001).

---

### I.6.3. GESTION DES RONGEURS

La lutte anti-rongeurs dans les plantations de palmiers à huile est basée sur deux stratégies complémentaires : la lutte chimique aux anticoagulants AVK, et depuis 1994 la lutte biologique.

La lutte biologique est basée sur l'introduction de la chouette effraie *Tyto alba* (Scopoli, 1769), un prédateur naturel des rongeurs. Cependant, l'introduction de ce prédateur n'est pas toujours possible, par exemple à Bornéo, où il pourrait y avoir une compétition interspécifique avec une espèce de chouette locale (com. Pers. Sudharto 2009). Certaines plantations sont donc uniquement traitées par AVK, lorsque l'introduction de la chouette n'est pas en vigueur.

Lorsque l'introduction de la chouette effraie est possible, l'AVK utilisé est le coumatétralyl, un anticoagulant de première génération. Des études montrent que l'intoxication secondaire au coumatétralyl est faible pour les prédateurs et les charognards (O'Connor *et al.* 2003). Bien

que possédant une demi-vie hépatique relativement longue, de 55 jours chez le rat (Fisher *et al.* 2003) et de 15,8 jours chez la souris (Vandenbroucke *et al.* 2008), Cependant, la lutte anti-rongeurs reste complexe. Par exemple, dans une plantation de Riau sur l'île de Sumatra, la seule utilisation de lutte biologique est efficace pour contrôler les populations de rongeurs. Par contre, sur l'île de Bangka, à l'Est de Sumatra, l'intensification des techniques de lutte ne suffit pas à contrôler les populations de rongeurs (trois fois plus de chouettes, abaissement des seuils de traitements au coumatétralyl, et utilisation de chiens pour la chasse), et un processus de résistance aux AVK est envisageable.

---

#### I.6.4. OBJECTIFS DE LA THESE

Ce présent travail s'inscrit dans la problématique de lutte contre les ravageurs en milieu agricole. Les plantations de palmiers à huile en Indonésie constituent un modèle d'étude pertinent, car ce sont des agro-écosystèmes de très grande échelle. La gestion durable de ces plantations constitue un enjeu écologique et économique mondial. La lutte contre les populations invasives de rongeurs demeure problématique dans certaines plantations. Or, le développement d'une lutte anti-rongeurs adaptée est une composante de la gestion durable de ces grandes monocultures.

L'étude de ces rongeurs en conditions naturelles est primordiale. Jusqu'à présent, très peu d'études ont été menées sur les rongeurs ravageurs des palmiers à huile, et la plupart ont été réalisées en Malaisie (Wood *et al.* 2003; Hafidzi & Saayon 2001).

L'objectif de cette thèse pluridisciplinaire est d'améliorer les connaissances sur la biologie de ces ravageurs peu étudiés, dans le but de fournir des outils nécessaires au développement de stratégies de lutte adaptées. Nos sites d'études sont localisés dans des plantations matures en Indonésie, où la gestion anti-rongeurs est standardisée (partie II.1.1).

Le travail réalisé au cours de ce projet s'est articulé autour de trois axes de recherche :

- 1- Le premier axe de recherche a été réalisé à l'échelle nationale. L'objectif de cette étude était d'estimer les facteurs environnementaux impliqués dans les processus d'invasion. Dans un premier temps, un inventaire a été réalisé dans l'ensemble du pays afin de déterminer les espèces présentes dans ces agro-écosystèmes et leur distribution. Dans un second temps, une approche corrélative a été utilisée afin d'étudier l'influence des facteurs environnementaux sur les distributions relatives de ces espèces.
  
- 2- Le deuxième axe de recherche a été réalisé à l'échelle de l'habitat cultivé. L'objectif était de déterminer localement les patrons de dispersions spatiales des populations invasives. Une étude comparative a été menée dans trois palmeraies aux caractéristiques écologiques différentes (e.g. habitats adjacents) : à l'extrême Ouest du pays dans la région de Riau à Sumatra, sur l'île de Bangka, et à l'extrême Est du pays à Irian Jaya. La compréhension de la structure génétique spatiale de ces populations constitue une information cruciale pour une lutte adaptée.
  
- 3- Le troisième axe de recherche a été réalisé à l'échelle de la population et de l'individu. L'objectif de cette étude était de rechercher l'existence d'un processus de résistance aux pesticides et de déterminer le mécanisme à l'origine de ce processus. L'étude a été menée sur deux populations distinctes : une population « sous contrôle » sans lutte chimique (à Riau, Sumatra) et une population invasive fortement exposées aux anticoagulants AVK (à Bangka). Ces connaissances permettent d'évaluer l'efficacité de la lutte chimique.

## MATERIELS ET METHODES





## II. MATERIELS ET METHODES

---

### II.1. ECHANTILLONNAGE

#### II.1.1. SITES D'ETUDE

Tous les sites d'étude sont des plantations de palmiers à huile matures, âgées de plus de dix ans, réparties dans toute l'Indonésie. Toutes ces plantations font l'objet d'un système de lutte standardisé d'approches multiples. La lutte biologique est largement développée dans les plantations matures. Elle consiste en l'introduction d'un couple de chouette effraie *Tyto alba* par parcelle de 30 hectares. La lutte chimique est également très répandue dans les plantations matures lorsque l'introduction de la chouette effraie est impossible (e.g. compétition avec une espèce locale), ou lorsque les dégâts enregistrés deviennent importants malgré la présence de cette dernière. Le traitement chimique utilise généralement un anticoagulant de première génération dérivé de la warfarine, le coumatétralyl, qui n'est pas toxique pour la chouette. Le traitement a lieu lorsque les dégâts enregistrés dépassent 10% de la récolte d'une parcelle de 30 hectares. Les appâts utilisés sont des blocs paraffinés formulés avec 1,125 ppm (parties par million) de coumatétralyl. La technique consiste à disposer un appât au pied de chaque palmier, remplacé tous les trois jours jusqu'à ce qu'il ne soit consommé qu'à 20%. Dans le cas où la chouette est absente, les AVK utilisés sont des molécules de seconde génération, (plus toxiques).

Afin de caractériser les populations de rongeurs invasives de cet agro-écosystème, un échantillonnage non exhaustif a été réalisé à travers l'Indonésie dans vingt-quatre plantations de palmiers à huile (Figure 18). L'estimation de la distribution des espèces de rongeurs et des facteurs l'influençant a été calculée à partir de cet échantillonnage (cf. partie II.1).

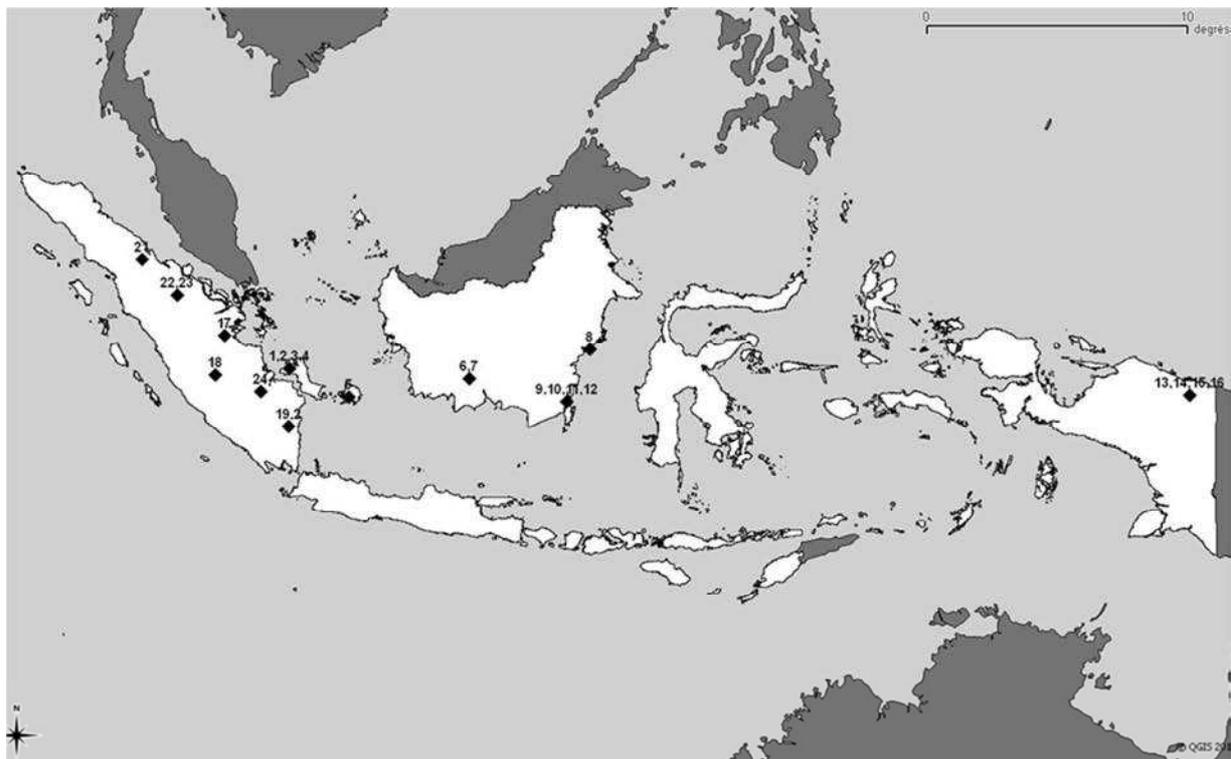
Parmi ces vingt-quatre sites, trois sites d'études ont été choisis pour des études plus approfondies : Riau, Bangka, et Irian Jaya (Figure 18). La structure génétique des populations

a été étudiée dans ces trois sites distincts (cf. partie II.2), choisis pour leurs caractéristiques écologiques très contrastées (e.g. situation géographique, typologie du paysage adjacent).

Le site d'échantillonnage de Riau est une plantation mûre de 23 ans d'une superficie de 5000 hectares, localisée sur l'île de Sumatra (E: 100°54' - 102°10'; N: 01°16' - 0°20') à l'extrême Ouest de l'Indonésie. La région de Riau se trouve dans la plus grande zone de forêts de plaine humide, de marais tourbeux et de mangroves de Sumatra (Whitten *et al.* 2000). Cette plantation est entourée par d'autres plantations de palmier à huile.

Le site d'échantillonnage de Bangka est une plantation mûre d'approximativement 16 ans d'une superficie de 5000 hectares. Elle est située sur une île de la province de Bangka-Belitung (E: 104°50' - 109°30'; S: 0°50' - 4°10'), au Sud-Est de l'île de Sumatra. L'habitat naturel de ce site est essentiellement composé d'habitats particuliers de forêts de plaine, décrit comme heath forest ou végétation padang, poussant sur des sols sableux très pauvres en éléments nutritifs (Whitten *et al.* 2000). Cette plantation est entourée de milieux agricoles variés (plantations de palmier à huile, cultures de poivre) et de forêts secondaires.

Le site d'échantillonnage d'Irian Jaya est constitué de deux plantations mûres adjacentes d'approximativement 16 ans et d'une superficie de 5000 hectares chacune. Elles sont localisées sur l'île de Papouasie à l'extrême Est de l'Indonésie. L'habitat naturel de ce site est principalement composé de forêts primaires. Contrairement aux deux sites précédents, inclus dans une matrice paysagère agricole, ce troisième site est enclavé dans une matrice de forêts primaires.



**Figure 18. Localisation géographique des sites d'échantillonnage des rongeurs dans les plantations de palmiers à huile en Indonésie.** Le numéro correspond au code utilisé dans la première étude (cf. partie II.2.) pour différencier les différents sites. Les sites de Riau (n°22), de Bangka (n°1, n°3) et d'Irian Jaya (n°13 et n°16) ont fait l'objet d'études approfondies (cf. partie II.3. et II.4.).

Les sites de Riau et de Bangka ont également fait l'objet d'études approfondies concernant la recherche des mécanismes de résistance (cf. étude II.3). Ils ont été choisis pour leurs différences marquées dans la gestion anti-rongeurs. Le site de Riau était uniquement géré par la lutte biologique depuis au moins six ans, contrairement au site de Bangka qui était systématiquement traité au coumatétralyl depuis au moins sept ans. Dans ce site, les dégâts enregistrés étaient importants et les techniques de lutte avaient été renforcées : jusqu'à trois fois plus de chouettes ont été introduites en plus du développement de la pratique d'une chasse avec des chiens. De même les seuils d'utilisation de raticide avaient été abaissés : le traitement commençait lorsque les dégâts enregistrés atteignent 5% de la récolte et s'arrête quand la consommation des appâts atteignait 15%. Selon l'année, l'utilisation de raticides à base de coumatétralyl à Bangka, variait de 1-2 kg/ha. Les deux années précédant l'étude, aucun autre pesticide n'avait été utilisé à Bangka (e.g. fongicides, insecticides).

---

## II.1.2. METHODE DE CAPTURE ET MATERIEL BIOLOGIQUE

L'ensemble de l'échantillonnage a été conduit au cours de l'année 2009 et durant le mois d'octobre 2010.

Tous les animaux ont été capturés avec des pièges de type Sherman, qui permettent de capturer les micromammifères vivants (Figure 19). Chaque piège a été appâté avec des morceaux de noix de palme fraîche afin d'optimiser la capture de rongeurs consommateurs de noix de palme plutôt que d'améliorer les taux de capture avec un appât plus appétant.

Chaque session de capture a été réalisée selon une méthode classique basée sur l'élaboration d'une grille de piégeage. Cette grille comportait des lignes de dix pièges disposés avec un intervalle régulier d'environ un mètre. Le nombre de lignes étant variable selon l'étude (respectivement 2, 5 et 10 pour les parties II.2, II.3, et II.4), les pièges ont donc été disposés uniformément pour couvrir une surface rectangulaire variant d'environ 20-100m<sup>2</sup>. Les pièges ont été disposés durant une nuit (période d'activité maximale des rongeurs). Il a été précédemment démontré que le biais engendré par cette méthode de capture est faible pour l'étude démographique de ces populations en conditions naturelles, car le succès de capture des espèces invasives des palmiers à huile dans le Sud-Est asiatique (i.e. *R. tiomanicus* et *R. tanezumi-R3*) est grand (Wood 1984 dans Wood & Fee 2003).

Les rongeurs capturés ont été rapidement emmenés dans un laboratoire de terrain pour être euthanasiés et analysés (morphométries, autopsies, récolte d'échantillons biologiques, photographies). L'euthanasie a été conduite par inhalation de chloroforme ou par rapide dislocation cervicale. Les mesures morphométriques ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le manuel de Herbreteau *et al.* (2011). Un morceau de tissu (queue ou oreille) a été prélevé et conservé à +4°C dans un microtube rempli d'alcool à 70° pour procéder à des analyses génétiques ultérieures (parties II.1.3, II.3.1 et II.4.2). Les corps ont ensuite été conservés dans l'alcool pour les études futures ou les éventuelles collaborations futures. Les sujets expérimentaux concernant l'étude physiologique et génétique de la résistance au coumatétralyl ont été maintenus 24 heures en captivité avant d'être euthanasiés (cf. partie II.4.).



**Figure 19. Illustration d'une session de piégeage** (photos personnelles)

Pour chaque individu capturé, les coordonnées géographiques ont été enregistrées avec un GPS (Global Positioning System) portatif sous le système de référence géodésique WGS84 (World Geodetic System 1984).

---

### II.1.3. IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES ESPECES

Les espèces de rongeurs ont été identifiées en utilisant des critères morphologiques (Aplin *et al.* 2003). Pour éviter les problèmes d'identification, les animaux ont également été identifiés en utilisant la méthode du **barcoding**, une approche moléculaire basée sur l'analyse des variations du gène *COI* (oxydase cytochrome 1) de l'ADN mitochondrial (Hebert *et al.* 2003). L'ADN a été extrait à partir des échantillons de tissus biologiques avec le réactif DirectPCR Lysis (Viagen). Une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée avec les amorces suivantes : l'amorce Sens « BatL5310 » (5'-ACTTCTGGGTGTCCAAAGAATCA-3') et l'amorce Anti-Sens « R6036R » (5'-CCTACTCRGCCATTTTACCTATG-3'). Les paramètres de cycles thermiques ont été les suivants: 4 min à 94° C, suivi de 40 cycles de 30 s à 94° C, 30 s à 48° C et 1 min à 72° C, puis une période d'extension finale de 10 min à 72° C.

Avant séquençage (Eurofins MWG / Operon), les amplicons ont été vérifiés par électrophorèse dans un gel d'agarose coloré avec 1,5% de bromure d'éthidium. L'identification des espèces a ensuite été réalisée avec l'outil de barcoding de RodentSEA, récemment développé pour les rongeurs du Sud-Est asiatique, qui est disponible gratuitement sur le site internet [http://www.ceropath.org/barcoding\\_tool/rodentsea](http://www.ceropath.org/barcoding_tool/rodentsea) (Chaval *et al.* 2010). Lorsque la base de données n'était pas suffisante pour identifier les espèces, deux outils complémentaires ont été utilisés : l'outil analytique développé par Barcode of Life Data (BOLD) disponible sur le site <http://www.barcodinglife.com> (Ratnasingham & Hebert 2007), ainsi que la méthode BLAST de National Center for Biotechnology Information (NCBI), disponible sur le site [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

En combinant ces approches (morphologiques et moléculaires), il a été possible d'identifier de manière fiable les différentes espèces de rongeurs avant de procéder à l'étude génétique.

## II.2. INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA DISTRIBUTION DES ESPECES

---

### II.2.1. JEUX DE DONNEES

377 micromammifères ont été capturés et identifiés par une approche moléculaire (barcoding) dans vingt-quatre palmeraies matures réparties dans toute l'Indonésie (Figure 18). La position géographique a été enregistrée pour chaque site. Les détections d'espèces ont été cartographiées et l'abondance relative des espèces dominantes a été calculée. Seules les deux

espèces dominantes (*Rattus tiomanicus* et le *Rattus tanezumi-R3*) et les sites possédant plus de cinq individus (n= 21 sites) ont été conservés pour l'analyse statistique. Ainsi, il a pu être établi une cartographie pertinente de la distribution relative des espèces.

L'analyse statistique utilisée est une analyse en composantes principales (PCA) intégrant une variable d'intérêt et trois catégories de variables explicatives. La **variable d'intérêt** est une variable quantitative discrète (positive ou nulle) de l'abondance relative des deux espèces, recensées sur un site de coordonnées X, Y. Les trois catégories de variables explicatives sont issues de « rasters » (couches de données pixélisées) disponibles sur internet : Bioclim (<http://www.worldclim.org>), Human Footprint V2 (<http://www.ciesin.columbia.edu>), et GlobCover (<http://ionial.esrin.esa.int>).

La **première catégorie de variables explicatives**, issue du jeu de données Bioclim (Hijmans *et al.* 2005) a été utilisée pour étudier l'influence des paramètres bioclimatiques sur la distribution des espèces. Avec une résolution spatiale de l'ordre du kilomètre, Bioclim est constitué de dix-huit variables dérivées des températures et des précipitations mensuelles. Ces variables ont été générées à partir d'enregistrements de l'année 1950 à 2000. Elles apportent souvent une explication biologique pour la distribution des espèces, car elles représentent des tendances annuelles, saisonnières moyennes ainsi que leurs extrêmes, qui sont potentiellement des facteurs environnementaux limitant pour la survie d'une espèce.

La **deuxième catégorie de variables explicatives** est le jeu de données Human Footprint V1 (Sanderson *et al.* 2002) élaboré autour de l'année 2000, avec une résolution spatiale de un kilomètre. Human footprint mesure l'influence de l'homme sur le paysage à partir de nombreux paramètres (e.g. routes, infrastructures, densités de population, milieux agricoles). Cette catégorie de variable est importante car de nombreuses études rapportent que les populations de rongeurs invasives des plantations de palmiers à huile appartiennent souvent à des espèces commensales de l'homme (*Rattus tanezumi-R3*).

La **troisième catégorie de variables explicatives** est le jeu de données Globcover qui est une variable qualitative discrète de 300 mètres de résolution spatiale. Globcover donne une description graduelle de la couverture paysagère, telle que le degré d'inondation ou le degré de couverture naturelle, qui caractérise la végétation du paysage (e.g. forêt, plaine, marécage) en vingt-trois classes d'habitats. Les indices Globcover utilisés dans l'analyse statistique sont dérivés de données satellites datant de décembre 2004 à juin 2006 et de janvier à décembre 2009. Des indices de fragmentation du paysage ont été calculés à partir des zones tampon extraites de ce troisième jeu de données :

(1) la proportion paysagère, codée « l\_p » (i.e. landscape proportion), qui est le pourcentage de pixels de chaque classe d'habitat inclu dans la zone tampon, c'est-à-dire la surface cumulée des patches d'une classe d'habitat rapportée à la surface totale analysée

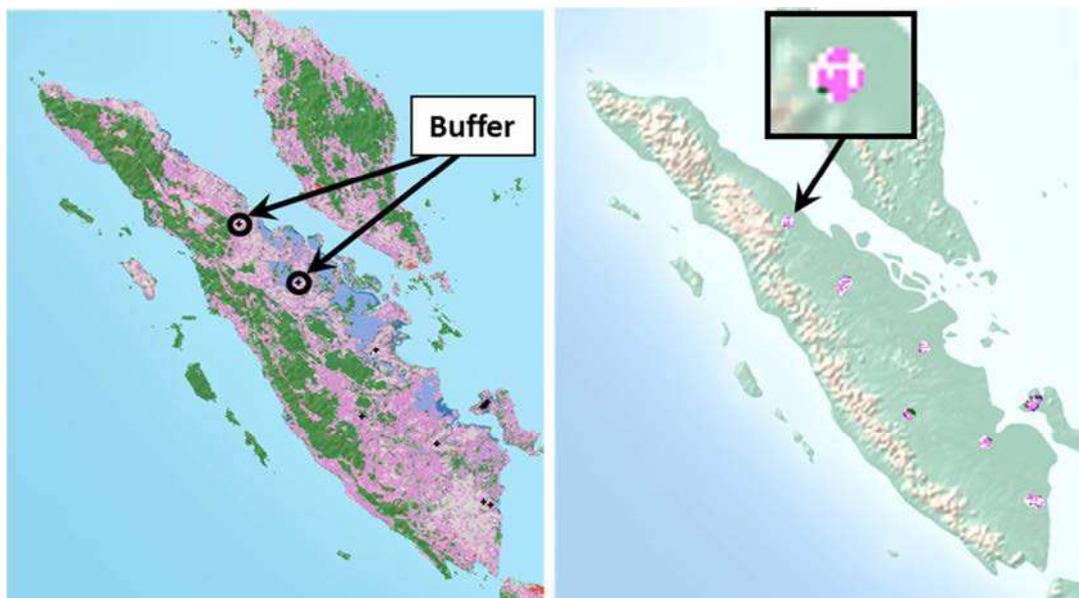
(2) la bordure paysagère, codée « e\_d » (i.e. edge density), qui est le nombre total de côtés de pixels d'une classe d'habitat adjacents avec un pixel d'une autre classe d'habitat, c'est-à-dire le périmètre cumulé des patches de chaque habitat inclu dans la zone tampon

(3) la densité des habitats, codée « p\_d » (i.e. patch density), qui divise le nombre de patch d'une classe d'habitat par la surface cumulée occupée par cet habitat, c'est-à-dire le nombre de patch par kilomètre carré. L'ensemble des données métriques ont été générées avec le logiciel GRASS GIS.

---

## II.2.2. ANALYSE STATISTIQUE MULTIVARIEE

Comme la résolution spatiale des différents jeux de données est hétérogène, et que les sites échantillonnés sont des grandes matrices agricoles homogènes d'environ 5 000 hectares, des zones tampon de dix kilomètres de rayon ont été extraites de chaque raster autour des coordonnées spatiales de chacun des sites (Figure 20). L'utilisation de ces zones tampons permet d'inclure une partie de la matrice environnementale adjacente de chaque plantation, qui est susceptible d'influencer la distribution relative des espèces. Les zones tampon ont été extraites de chaque raster avec le logiciel GRASS GIS (Neteler *et al.* 2012).



**Figure 20. Illustration d'extraction des zones tampons (buffer).** A gauche, le raster Globcover de Sumatra, avec les sites d'études en point noir. A droite, la carte de Sumatra dont seules les zones tampons du Globcover ont été conservées pour chaque site.

L'analyse en composantes principales (PCA) a été réalisée sur l'ensemble des jeux de données avec le logiciel statistique R (R Development Core Team 2006).

### II.3. PATRONS DE DISTRIBUTION LOCALE DES ESPECES INVASIVES

#### II.3.1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET GEOGRAPHIQUE

##### **Dans les habitats environnants**

Un échantillonnage complémentaire a été réalisé à Bangka et à Irian Jaya, afin d'évaluer la présence de rongeurs invasifs dans d'autres habitats présents dans l'environnement cultivé.

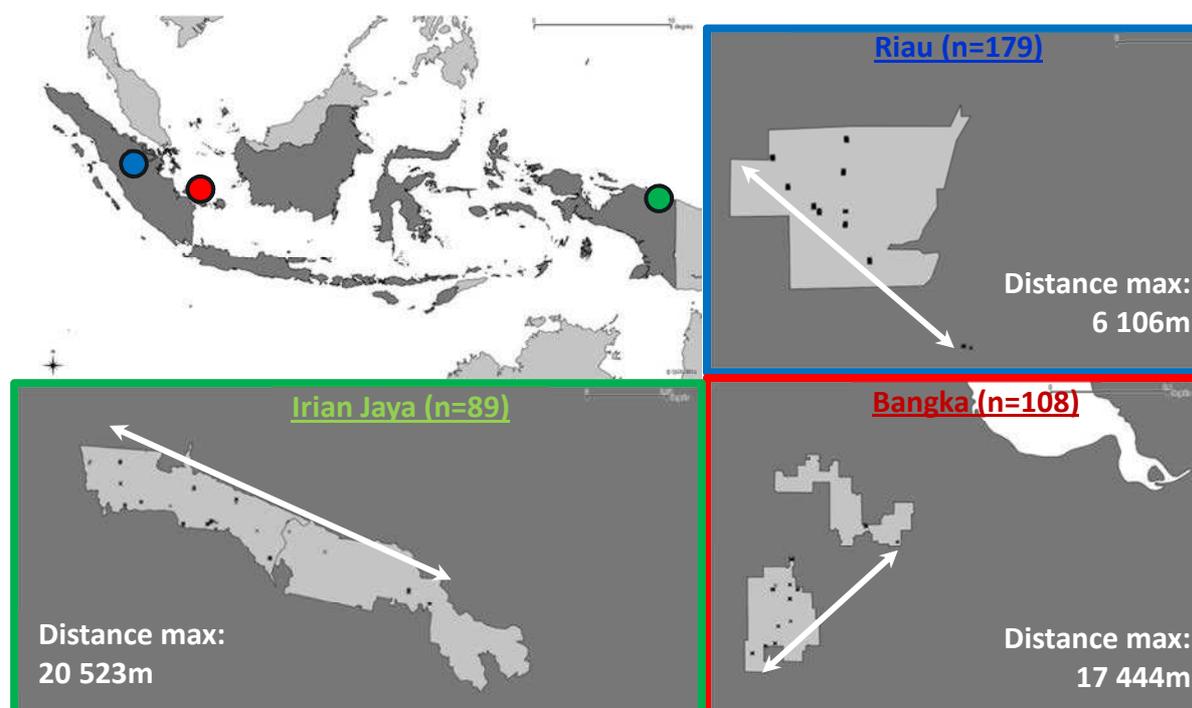
Dans chaque site, deux villages situés à l'intérieur des plantations, ainsi que deux habitats naturels adjacents aux plantations ont été échantillonnés par une session de piégeage. A Irian Jaya, cette méthode d'échantillonnage non exhaustive a permis de capturer quinze animaux dans deux habitats forestiers (n=13 et n=2) et vingt-neuf animaux dans deux villages (n=19 et n=10). A Bangka, un total de trente-trois micromammifères a été capturé dans deux habitats forestiers (n=17 et n=16) et treize rongeurs ont été piégés dans deux villages distincts (n=9 et n=4).

Un autre village a été échantillonné à proximité du site de Riau. Ce village d'une dizaine d'années s'est établi, suite aux activités agricoles, sur un axe routier important qui relie les plantations aux villes commerciales. Trente-deux rongeurs ont été capturés dans cet habitat rural entouré de plusieurs plantations de milliers d'hectares.

### Dans les plantations

Au total, 376 rats sauvages ont été capturés dans les plantations de palmiers à huile matures de Riau (n=179), Bangka (n= 108) et Irian Jaya (n=89) (Figure 21). Les rongeurs de Riau ont été échantillonnés en groupes de 19 à 20 individus sur 10 points d'échantillonnage à des intervalles de distance variables pour inclure différentes échelles spatiales. Un échantillonnage individuel a été réalisé dans les sites de Bangka et d'Irian Jaya. Tous les animaux ont été identifiés sur la base de critères morphologiques et certains d'entre eux ont été identifiés par une approche moléculaire (i.e. barcoding).

Seuls les individus appartenant à l'espèce invasive ont été utilisés pour les analyses de génétique des populations décrites ci-dessous.



**Figure 21.** Echantillonnage des rats (*R. tiomanicus* et *R. tanezumi*R3) ayant servi aux analyses génétiques dans les trois sites.

## **Les coordonnées spatiales**

Les coordonnées géographiques ont été enregistrées pour chaque animal avec un GPS manuel sous un système de géoréférencement WGS84. Il a été nécessaire de convertir ces données en distances métriques pour obtenir les distances spatiales séparant chaque individu. Les coordonnées angulaires (latitude et longitude) ont été projetées dans un système de coordonnées cartésiennes à deux dimensions avec le logiciel postGIS (postGIS 2007) en utilisant les zones UTM (Universal Transverse Mercator) correspondant à la localité géographique des sites d'étude : N47 pour Riau, S48 pour Bangka, et S54 pour Irian Jaya. Cette transformation est peu biaisée pour les localités proches de l'équateur comme l'Indonésie. Les matrices de distances euclidiennes inter-individuelles ont été construites avec le logiciel SPAGEDI (Hardy & Vekemans 2002) pour chacun des sites.

## **Les microsatellites**

L'ADN génomique a été extrait à partir des échantillons tissulaires avec le kit d'extraction DirectPCRLysis Reagent (Viagen). Pour quantifier les variations génétiques de tous les rats échantillonnés, les réactions en chaîne de la polymérase (PCR) ont été réalisées avec des amorces de sept loci microsatellite (Tableau 2). Certains de ces marqueurs ont été développés sur *Rattus norvegicus* (Jacob *et al.* 1995) et ont été utilisés dans des études de génétique des populations chez *Rattus rattus* (Gilbert *et al.* 2007; Abdelkrim *et al.* 2005b). Les autres marqueurs utilisés ici ont été initialement caractérisés pour *Rattus rattus* (Loiseau *et al.* 2007).

Les sept loci polymorphiques ont été amplifiés par deux PCR touchdown indépendantes (D10Rat20 et D18Rat75) et deux PCR multiplex différentes (pour Rr114, Rr068, D11Mgh5, et pour Rr021, D11Rat56). Les amorces Sens (Forward) ont été marquées avec différents fluorochromes afin de permettre les analyses simultanées des loci ayant des longueurs d'allèles similaires. Les deux PCR touchdown ont été initiées par une étape d'activation à 95 °C for 15 min, suivies par 8 cycles de [dénaturation à 94°C pendant 30 sec - hybridation à 53°C pendant 1 min 30 sec (avec diminution de la température de 1°C par cycle) - élongation

à 72°C pendant 1 min 30 sec], et terminées par une extension finale à 60°C pendant 30 min. Les deux PCR multiplex ont été initiées à 95°C pendant 15 minutes, suivies par 40 cycles (30 sec à 94°C, 1 min 30 sec à 60°C, et 1 min à 72°C) et terminées par une élongation finale à 60°C pendant 30 min.

Primer No	Forward Sequence	Reverse Sequence	Repeat Motif	PCR Product Size (bp)	Dye	GenBank Accession No	PCR No	Bib. Ref.
D10Rat20	GAAATGGCCAG GATAAACCA	AGTGATTGCC ATACCTGCCT	(TG)	113-129	FAM	UniSTS:118165	3	1
Rr021	AGTCAGTGTGG AGCAGGCA	GAGAAATTC AACCTCAACT GC	(GT)	207	FAM	EU272139	2	2
Rr114	GCTGTGGCTAG AATCCAAGG	ATGAGGCCTG TGGACGGTA	(GT) (GA)	356	FAM	EU272137	1	2
D18Rat75	ACCCACATTGA ACAGAACCA	CACACTCAGG TGGAAAAGCA		184	HEX	UniSTS:118478	4	1
D11Mgh5	GAATCGATTGA CAGATGTCTGT G	CAGCTCTAATT CCAGAAAGGT TT		242	HEX	UniSTS:118224	1	1
Rr068	GACTTCCTATC CAGACAGAG	CTGAAGCTAT AAAGTGAGAT CTA	(GT)	106	NED	EU272143	1	2
D11Rat56	ATGCCACACA TGAGTAAA	GCCAAGTCTT TTCAAGTGCG		195	NED	UniSTS:226416	2	1

**Tableau 2. Séquences des amorces des microsatellites.**

Bib. Ref.= Bibliography references ; Bib ref (1) see Jacob *et al.* 1995 ; Bib ref (2) see Loiseau *et al.* 2008

Après les PCR, la qualité des amplicons a été vérifiée sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, puis les amplicons ont été séquencés (Eurofins MWG/Operon). Chaque individu a été génotypé par deux lectures indépendantes avec le logiciel GeneMapper (Applied Biosystems) qui permet d'évaluer la taille des allèles.

Comme tous les individus n'ont pas été identifiés par barcoding, la première étape était de vérifier de manière exploratoire que tous les individus appartenaient à la même espèce. Une espèce est communément définie comme un groupe d'organismes avec un isolement reproductif intrinsèque. Ce concept est basé sur l'absence de flux de gènes entre les groupes, pouvant ainsi évoluer indépendamment et accumuler des différences dues à des adaptations locales ou à la dérive génétique. Des espèces en fin de spéciation peuvent ainsi se séparer en groupes génétiques (Hausdorf & Hennig 2010). Pour visualiser les connexions génétiques

entre les rats des populations échantillonnées, une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée avec le logiciel GENETIX 4.0 (Belkhir *et al.* 2000) avec le jeu de données microsatellites pour chacun des sites. Cette analyse a permis de projeter graphiquement les individus sans assignation à priori à partir des profils génétiques multi-locus. Couplée avec les identifications moléculaires (i.e. barcoding), cette approche exploratoire descriptive a permis de confirmer les identifications morphologiques des espèces sur le terrain.

---

### II.3.2. ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les analyses ont été réalisées sur les jeux de données microsatellites et indépendamment pour chaque site d'étude.

#### **Statistique descriptives**

Trois tests standards ont été réalisés avec le logiciel Genepop v.4.1.1. (Rousset 2008) :

- (1) Test exact pour l'équilibre génotypique de Hardy-Weinberg (avec 1 000 permutations)
- (2) Test exact pour le déséquilibre de liaison entre chaque paire de loci qui permet d'identifier si les loci utilisés sont physiquement proches auquel cas leur valeur informative serait biaisée
- (3) Estimation du  $F_{IS}$  (Weir & Cockerham 1984) qui mesure l'écart à l'équilibre théorique d'Hardy-Weinberg au sein d'une population.

Les  $F_{ST}$  (Weir 1996) non biaisés ont été calculés entre les différents sites d'études avec le logiciel FreeNA (Chapuis & Estoup 2007) et la méthode ENA pour mesurer les écarts à l'équilibre d'Hardy-Weinberg entre les populations. Pour chaque locus, la valeur d'hétérozygotie observée et la valeur non biaisée d'hétérozygotie attendue (Nei 1973) ont été calculées avec le logiciel GENETIX 4.0 (Belkhir *et al.* 2000).

Le logiciel Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.* 2004) a servi à discriminer les éventuelles erreurs de génotypage, dus à des artefacts techniques (stuttering, dropout, allèles nuls),

sources potentielles d'un déficit apparent d'hétérozygotes (Pompanon *et al.* 2005). Le logiciel FreeNA a permis d'estimer les fréquences d'allèles nuls pour détecter des « faux homozygotes ».

Les marqueurs microsatellites détectés pour avoir des allèles nuls, c'est-à-dire des allèles non amplifiés au cours de la PCR, n'ont pas été retirés des analyses d'assignation et de de structure génétique spatialisée, car la probabilité des fréquences d'allèles nuls était modérée ( $r < 0.20$ ). Les allèles nuls réduisent légèrement la puissance des tests d'assignations sous le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) mais n'affectent pas le résultat global de ces tests (Carlson 2008), et les analyses basées sur la distance géographique sont tout aussi performantes (Cornuet *et al.* 1999).

Le nombre d'allèles observé dépend fortement de la taille des échantillons. Ainsi, la richesse allélique a été calculée avec le logiciel FSTAT (Goudet 2001) qui pondère le nombre d'allèle par la taille de l'échantillon et limite le biais dû à l'échantillonnage.

## **Structure génétique des populations**

Les tests d'assignation ont été réalisés avec le logiciel STRUCTURE pour estimer le nombre de dèmes (sous-population) présents dans les sites échantillonnés sans à priori. L'algorithme MCMC (Markov Chain Monte Carlo) permet de regrouper des individus dans des populations à l'intérieure desquelles les loci sont considérés à l'équilibre d'Hardy-Weinberg et en équilibre de liaison. Les paramètres utilisés ont été les suivants : modèle avec admixture ( $\alpha=1$ ) et fréquences alléliques corrélées. Le nombre de répétition de la chaîne de Markov a été fixé à 600 000 itérations après une période de mise en route de 300 000 itérations pour minimiser l'effet de configuration de l'allumage. Avec ces paramètres, les probabilités  $\ln \Pr(X|K)$  ont été estimées pour un nombre de dèmes K compris entre 1 et 10 avec 100 répétitions pour chaque valeur de K testée. Une analyse globale incluant tous les sites d'étude a également été réalisée avec un modèle de fréquences alléliques indépendantes, qui suppose des fréquences alléliques différentes pour chaque site.

Les probabilités obtenues  $\ln \Pr(X|K)$  ont été corrigées avec la méthode Evanno qui calcule un meilleur prédicteur du nombre de population  $\Delta K$  à partir des probabilités obtenues avec STRUCTURE (Evanno *et al.* 2005). Ce test *ad hoc* a été réalisé avec l'application internet Structure Harvester v.0.6 (Earl *et al.* 2011). Parmi les 100 itérations réalisées sous STRUCTURE, plusieurs modes d'assignation des individus dans les populations peuvent être décrits. Le logiciel CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) a permis d'étudier ces différents modes.

### **Structure spatiale des populations**

Les analyses réalisées avec les tests d'assignation de STRUCTURE ne permettent pas de détecter des structures graduelles telle que le patron d'isolement par la distance. Des tests d'autocorrélation spatiale ont été réalisés avec le logiciel SPAGEDI (Hardy & Vekemans 2002), afin de calculer un coefficient d'apparentement moyen en fonction de la distance qui sépare deux individus. Les tests ont été réalisés avec 10 000 permutations aléatoires pour estimer la significativité des valeurs observées par rapport aux valeurs attendues dans une population sans structure spatiale. Le coefficient d'apparentement  $F_{ij}$  défini par Loiselle *et al.* (1995) n'impose pas que les populations soient à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (Vekemans & Hardy 2004). Le coefficient  $F_{ij}$  est borné par  $[-1 ; +1]$ . Une valeur positive significative de  $F_{ij}$  indique que les paires d'individus d'une classe de distance ont plus d'allèles en commun qu'attendu, alors qu'une valeur négative significative indique que ces individus ont moins d'allèles en commun qu'attendu. Les valeurs  $F_{ij}$  non significatives indiquent que les génotypes sont distribués de manière aléatoire dans une classe de distance. Pour une meilleure comparaison, les classes de distances de 1000 mètres  $[0 ; 19000]$  ont été choisies pour les deux sites échantillonnés individuellement (Bangka et Irian Jaya). Pour éviter un biais des coefficients de corrélation pour le site de Riau, échantillonné en populations, les comparaisons ont été réalisées pour des classes de distances contenant un nombre de paires d'individus similaire.

## II.4. ÉVALUATION DE LA RESISTANCE AUX ANTICOAGULANTS AVK

### II.4.1. SENSIBILITE PHENOTYPIQUE AU COUMATETRALYL

128 rats sauvages ont servi aux expérimentations du test BCR qui mesure la réponse physiologique à l'exposition aux anticoagulants AVK et permet de déterminer la sensibilité phénotypique d'une population (Prescott & Buckle 2000). Cinquante rats ont été capturés dans la plantation de Riau, non traitée aux anticoagulants, et soixante-dix-huit rats provenaient de la plantation de Bangka intensément traitée au coumatétralyl. Après leur capture, les animaux ont été maintenus 24h dans des cages individuelles avec de la nourriture *ad libitum* (noix de palme). Les rongeurs choisis pour les expériences étaient des rats adultes capturés en Mars et Avril 2009. Respectivement dix-neuf et trente-six rats de Riau et Bangka ont été identifiés par une approche moléculaire (barcoding).

Les traitements sur les rongeurs ont été validés et approuvés par le comité d'éthique de Vetagro Sup de l'université de Lyon. Vingt-quatre heures avant la mesure du temps de coagulation (PT), différents groupes de rats ( $n \geq 4$ ) ont été exposés à une dose déterminée de coumatétralyl. Les doses ont été injectées par voie intra-péritonéale, qui équivaut aux applications orales (Pelz *et al.* 2005). La dose efficace ( $ED_{50}$ ) est définie comme la concentration d'AVK nécessaire pour obtenir une réponse positive chez au moins 50% de la population exposée au pesticide. Aucune expérience de ce type n'ayant été menée sur ces espèces asiatiques, la dose efficace pour les souches sensibles de rats bruns *Rattus norvegicus* ( $ED_{50Rn}$ ) a servi de référence pour les expérimentations ( $ED_{50} = 0,36 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour les mâles et  $ED_{50} = 0,44 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour les femelles) (Prescott 2003). Chaque groupe de rats ( $n \geq 4$ ) a été exposé à une dose croissante de coumatétralyl de 0 à 32 fois la dose de référence ( $ED_{50Rn}$ ). Le groupe témoin ( $0 \times ED_{50Rn}$ ) a reçu une injection de solution saline physiologique, et a servi à déterminer le temps de coagulation du sang basal de l'espèce. Vingt-quatre heures après l'injection, les rats ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane (Forene ®, laboratoire Abbot, France), puis une goutte de sang a été collectée par prise de sang intracardiaque et immédiatement transférée dans une cartouche IDEXX Coag Dx™ afin de déterminer le

temps de coagulation (PT) avec l'appareil Coag Dx <sup>TM</sup> (saturation à 100 secondes). L'euthanasie par dislocation cervicale a été réalisée rapidement après la prise du sang.

---

#### II.4.2. AMPLIFICATION ET SEQUENÇAGE DE *VKORC1*

Trente séquences de gène *vkorc1* ont été étudiées chez des rats sélectionnés sur la base de leur réponse phénotypique au coumatétralyl. Le gène *vkorc1* est constitué de trois exons dont le troisième comprend le site actif et la plupart des mutations conférant la résistance chez *Rattus norvegicus*. L'exon 3 a été séquencé chez treize rats de Riau et dix-sept rats de Bangka. Parmi ces individus, la séquence a été complètement analysée (exon1,2,3) pour huit individus de chaque site.

L'ADN a été extrait à partir des échantillons de tissu collectés après l'euthanasie avec le kit Macherey-Nagel Nucleospin® Tissue (Hoerd, France). La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a été réalisée comme décrit par Grandemange *et al.* (2010). Un amplicon de 2209 pb (paires de base) a été obtenu pour le gène *vkorc1* complet, et un amplicon de 203 pb a été obtenu pour l'exon 3. La qualité des amplicons a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium, et conservés à + 4 ° C jusqu'au séquençage (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France).

Les séquences obtenues ont été alignées avec la séquence consensus du gène *vkorc1* de *Rattus norvegicus* (ENSRNOT00000026347) de la base de données Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Les mutations ont été détectées avec l'éditeur d'alignement des séquences BioEdit version 7.0.9,0 (Hall 1999). Chaque séquence a été corrigée manuellement, puis assemblées avec le logiciel Seaview 4.2.12 (Gouy *et al.* 2010) pour la reconstitution des gènes complet. Les haplotypes de *vkorc1* ont été déposés dans la base de données GenBank (JN129977-JN129984). Enfin, l'effet du polymorphisme des mutations ponctuelles d'un seul nucléotide (SNP) a été étudié et comparé avec les séquences *vkorc1* d'autres espèces de *Rattus* provenant de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *Rattus Losea* de Chine (EF028346. 1) *Rattus rattus alexandrinus* de l'Ouganda (HM181983.1).



## RESULTATS





### III. RESULTATS ET DISCUSSION

#### III.1. DISTRIBUTION DES ESPECES

##### III.1.1. INVENTAIRE QUALITATIF DES ESPECES

Sept espèces de micromammifères ont été identifiées dans l'ensemble des palmeraies (Tableau 3). Les espèces connues pour être dominantes dans les plantations de palmiers à huile en Malaisie sont présentes dans la totalité des sites échantillonnés en Indonésie (n=24) : le rat asiatique des maisons *Rattus tanezumi-R3* est présent dans 83,33% des sites (n=20) et le rat des champs malais *Rattus tiomanicus* est présents dans 45,83% des sites (n=11). Ces deux espèces sont sympatriques dans 29,16% des sites (n=7) (Figure 22). Pour chaque site, une des deux espèces semble dominante, car en sympatrie les proportions ne sont jamais équilibrées et au maximum l'espèce la moins représentée atteint 20% des captures (Tableau 3).

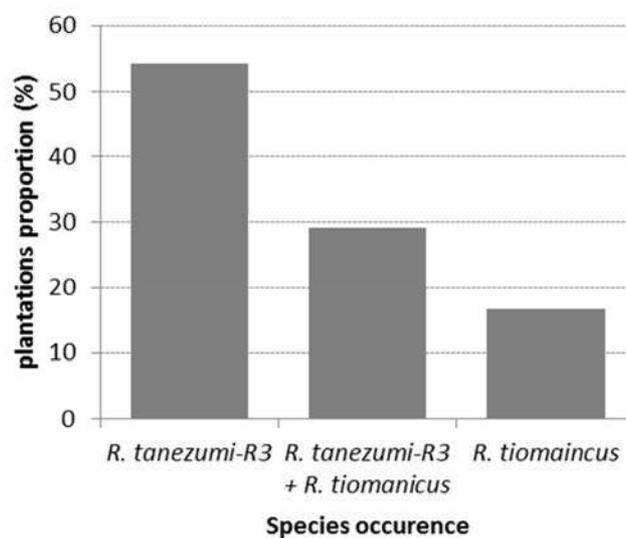


Figure 22. Taux de présence des espèces prédominantes dans les palmeraies

Region	n° plantation	<i>Rattus tanezumi-R3</i>	<i>Rattus tiomanicus</i>	<i>Rattus argentiventer</i>	Autres (n=1)	Total
Bangka	1	122	2	-	<i>Sundamys muelleri</i>	125
	2	10	-	-	-	10
	3	22	-	-	-	22
	4	9	-	1	-	10
Belitung	5	12	1	-	-	13
Bornéo Centre	6	2	8	2	-	12
	7	11	2	-	-	13
Bornéo Est	8	13	-	-	-	13
Bornéo Sud	9	5	-	-	<i>Maxomys whiteheadi</i>	6
	10	1	-	-	-	1
	11	5	-	-	-	5
	12	1	-	-	-	1
Irian Jaya	13	10	-	-	<i>Echymipera rufescens</i>	11
	14	4	-	-	Sp. non identifiée	5
	15	7	-	-	-	8
	16	9	-	-	-	9
Sumatra Indragiri	17	-	17	-	-	17
Sumatra Jambi	18	-	20	-	-	20
Sumatra Lampung	19	5	-	-	-	5
	20	4	1	-	-	5
Sumatra Nord	21	-	5	2	-	7
Sumatra Riau	22	7	28	-	-	35
	23	-	5	-	-	5
Sumatra Sud	24	8	12	-	-	20
Total	24	267	101	5	4	378

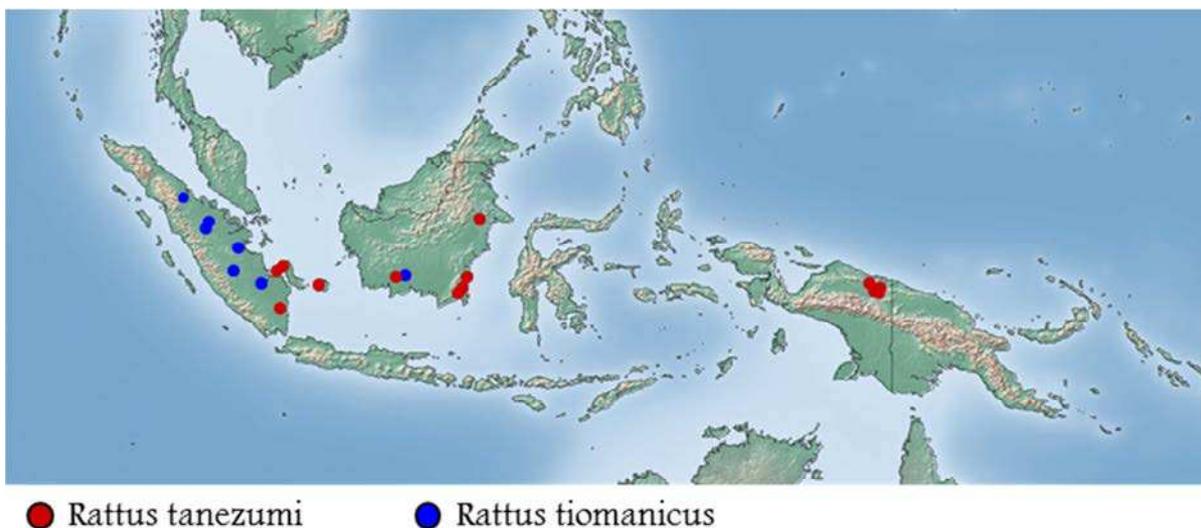
**Tableau 3. Identification des espèces de micromammifères dans les palmeraies.** Pourcentage d'identification dans les bases de données : *Sundamys muelleri* (99.69% BOLD), *Maxomys whiteheadi* (100% BOLD), *Echymipera rufescens* (92% NCBI), sp. non identifiée associée à *Leggadina lakedownensis* (88% NCBI)

Le rat des rizières *Rattus argentiver*, réputé pour occuper les plantations immatures, est présent dans 12,5% des sites (n=3), au nord de Sumatra, à Bangka et dans la région centrale de Bornéo, en sympatrie avec au moins une des deux espèces dominantes. Quatre espèces forestières endémiques ont également été identifiées, représentées à chaque fois par un seul spécimen, dont la description succincte est donnée dans la partie II.2.1 :

- le rat géant de Müller *Sundamys muelleri* (Jentink, 1879) à Bangka

- le rat épineux à tête blanche *Maxomys whiteheadi* (Thomas, 1894) dans la région sud de Bornéo
- une espèce identifiée à 92% comme étant un péramèle roux *Echymipera rufescens* (Peters & Doria, 1875)
- une espèce inconnue identifiée à 88% comme une Souris du pays des lacs *Leggadina lakedownensis* (Watts, 1976) à Irian Jaya. Le degré de fiabilité de l'identification moléculaire n'est pas satisfaisant pour affirmer l'identité de ce dernier spécimen.

La carte illustrant la distribution de chaque espèce (Figure 23) montre une légère variation clinale des distributions des deux espèces dominantes, selon un gradient longitudinal avec *Rattus tanezumi-R3* plus présent à l'Est et *Rattus tiomanicus* principalement présent dans la partie Ouest de l'Indonésie.



**Figure 23. Carte de distribution des espèces prédominantes dans les palmeraies**

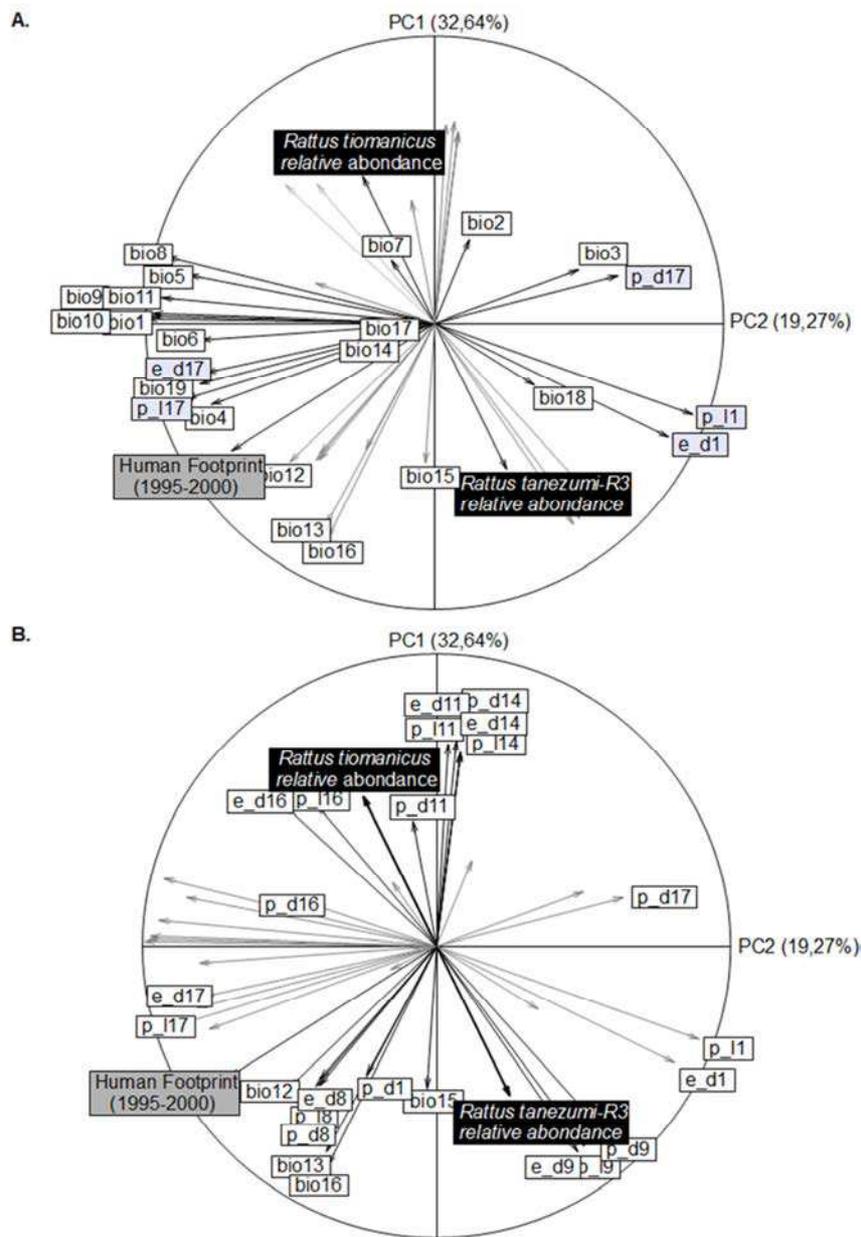
### III.1.2. INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

L'ACP permet d'observer d'éventuels regroupements de facteurs. Pour une interprétation claire des résultats, deux représentations graphiques de l'ACP ont été réalisées (figure 24). La première figure illustre l'ensemble des variables bioclimatiques, ainsi que les autres variables

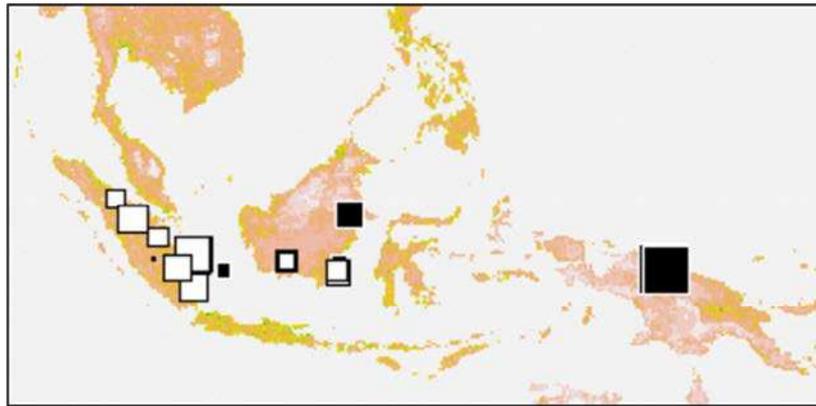
associées au premier axe (première composante principale, PC1). La deuxième figure représente l'ensemble des variables du couvert végétal et les autres variables associées à l'axe 2 pour expliquer la deuxième composante principale (PC2). La variable « Human Footprint » et la variable d'intérêt correspondant à l'abondance relative des espèces dominantes sont représentées à chaque fois afin de les associer avec les variables environnementales explicatives.

La contribution des axes à la variance totale est respectivement de 32,64 % pour PC1, 19,27% pour PC2 et 15,33%, pour PC3. PC1 et PC2 expliquent à eux deux plus de 50% de la variance totale. Le troisième axe (PC3) étant peu informatif sur les regroupements de facteurs, il n'a donc pas été retenu pour les interprétations.

La première composante principale (PC1), est principalement représentée par les variables bioclimatiques. Quasiment toutes ces variables, exceptées « bio3 » et « bio18 », contribuent négativement à PC1. L'association de l'abondance relative des deux espèces aux variables bioclimatiques est légèrement différente. L'abondance relative de *Rattus tiomanicus* est faiblement associée aux variations climatiques sur PC1. A l'inverse, l'abondance relative de *Rattus tanezumi-R3* n'est pas associée à ces variables. Dans l'ensemble, la distribution relative des espèces n'est pas associée aux facteurs environnementaux. La variable anthropique Human Footprint contribue légèrement aux valeurs négatives de PC1. Cet axe serait caractérisé par un gradient longitudinal, comme le montre la figure 25, où les valeurs absolues des coordonnées PC1 de chaque site d'étude ont été représentées géographiquement.



**Figure 24. Projection des variables sur le plan factoriel.** Pour plus de lisibilité, l'ACP est représentée sur deux figures distinctes. L'abondance relative et Human Footprint sont représentées sur les deux figures. (A) La figure indique l'ensemble des variables bioclimatiques, ainsi que les autres variables associées à la première composante principale (PC1). (B) La figure indique l'ensemble des variables du couvert végétal et les autres variables associées à l'axe 2 pour expliquer la deuxième composante principale (PC2).



**Figure 25. Projection géographique des valeurs absolues des coordonnées PC1** de chaque site d'étude. La dimension des carrés est proportionnelle à la valeur absolue attribuée à chaque site. La couleur symbolise le signe de cette valeur (blanc pour les valeurs négatives et noir pour les valeurs positives).

La seconde composante principale (PC2) est représentée par l'abondance relative des espèces. L'abondance relative de *Rattus tiomanicus* contribue aux valeurs positives de PC2, alors que celle de *Rattus tanezumi-R3* contribue aux valeurs négatives de PC2. La variable représentant les influences anthropiques « Human Footprint » contribue également aux valeurs négatives de PC2.

Seulement deux variables de couverture végétale du jeu de données « GlobCover » contribuent à l'axe 1. Elles correspondent aux habitats 1 (forêts aux feuilles larges et persistantes) et 17 (Mosaïque de terres cultivées / Forêts / Autres végétations naturelles). L'habitat 1 contribue aux valeurs positives de PC1 et l'habitat 17 aux valeurs négatives de PC2. Les indices de fragmentation de la densité de ces habitats ( $d_p$ ) contribuent aux valeurs positives de PC1 pour l'habitat 17 et aux valeurs négatives de PC2 pour l'habitat 1.

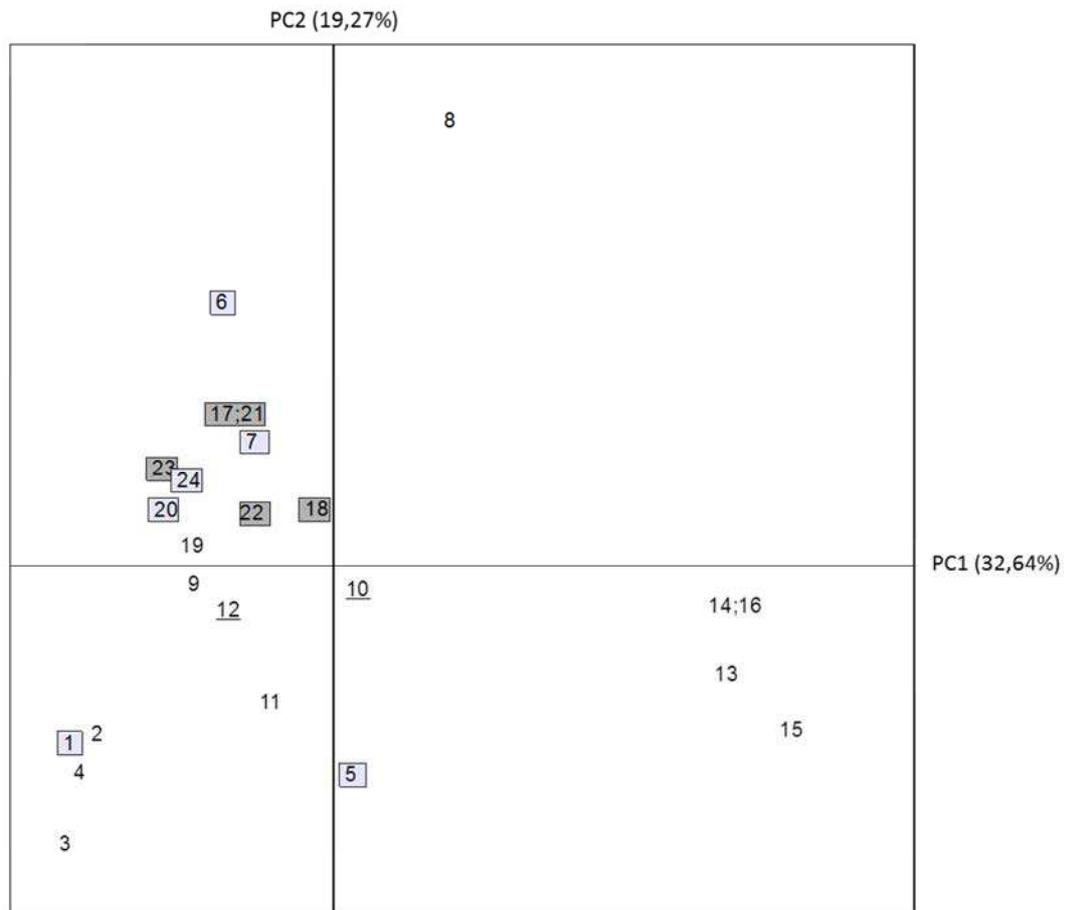
Les autres variables de couverture végétale contribuent principalement à l'axe 2, Les variables 11, 14 et 16 contribuent aux valeurs positives de PC2, de même que l'abondance relative de *Rattus tiomanicus*. Les variables 11 et 14 caractérisent l'habitat naturel de *Rattus tiomanicus* (Myers *et al.* 2012 ; Wilson & Reeder 2005). La variable 11 caractérise une couverture arbustive à feuilles persistantes et la variable 14 correspond à une couverture arbustive ou d'herbacées clairsemée. La variable 16 concerne quant à elle des surfaces cultivées. Les variables 8 et 9 contribuent aux valeurs négatives de PC2, comme l'abondance relative de *Rattus tanezumi-R3*. La variable 8 caractérise une classe d'habitat forestier régulièrement

inondé et la présence d'eau salée, alors que la variable 9 est une mosaïque de forêt et d'autres végétations naturelles (Annexe I).

Les variables indiquant les indices de fragmentation, « proportion de paysage », « densité des habitats » et « bordure paysagère », d'un même habitat ont sensiblement le même niveau de contribution aux composantes principales.

La figure 26 est une projection des différents sites d'étude sur le plan factoriel. Cette représentation montre que les sites d'Irian Jaya (n° 13-16) sont associés aux variables caractérisant des forêts aux feuilles larges et persistantes (variable 1), et à la variable de la densité des patchs d'habitat mosaïque de terres cultivées et de forêt (variable 17). Or les sites de cette zone d'étude sont enclavés dans une grande matrice environnementale de forêts primaires (cf. partie II.1.1). Les sites d'études de Bangka (n°1-4) sont associés avec le facteur anthropique Human Footprint, les habitats de type mosaïque de terres cultivées et de forêt (variable 17), et les habitats de type forestier régulièrement inondé et la présence d'eau salée (variable 8). Or ces sites sont situés sur une petite île au Sud-Est de Sumatra. L'île de Belitung (n°5), qui est géographiquement proche de l'île de Bangka, est associée avec ces mêmes variables sur PC2. Il en est de même pour un site du Sud de Bornéo (n°11), localisé en bord de mer.

Un site localisé à l'Est de Bornéo est fortement associé avec les habitats arbustifs (variable 11 et 14). De même, mais de façon plus modérée pour un site du centre de Bornéo (n°6). Les autres sites ne sont sensiblement pas associés aux variables environnementales.



**Figure 26. Projection des sites sur le plan factoriel.** Les sites où seul *Rattus tiomanicus* est présent sont en gris foncé. Les sites où les deux espèces sont présentes (*R. tiomanicus*, et *R. tanezumi-R3*) sont en gris clair. Dans les autres sites, seul *Rattus tanezumi-R3* a été détecté. Les sites soulignés sont ceux qui ont été retirés de l'analyse statistique du fait de leur faible effectif.

## III.2. DISPERSION SPATIALE DES POPULATIONS EN PALMERAIE

### III.2.1. UTILISATION DES DIFFERENTS HABITATS D'UNE PALMERAIE

En complément de l'échantillonnage réalisé dans les habitats cultivés, un échantillonnage non exhaustif a été réalisé dans des villages et dans des habitats naturels adjacents aux zones cultivées, afin d'appréhender l'occupation des différents types d'habitats d'une palmeraie.

Respectivement 121 et 144 individus ont ainsi été capturés à Irian Jaya et à Bangka (Tableau 4). Au total, huit espèces endémiques ont été identifiées : trois à Irian Jaya et cinq à Bangka.

#### Irian Jaya

Habitat	Espèce <i>Rattus tanezumi-R3</i>	<i>Sp. non identifiée</i>	<i>Hydromys sp.</i>	<i>Echymipera Rufescens</i>
Cultivé	62	9	4	2
Naturel	-	13	2	-
Rural	28	-	-	1
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>22</b>	<b>6</b>	<b>3</b>

#### Bangka

Habitat	Espèce <i>Rattus tanezumi-R3</i>	<i>Niviventer cremoriventer</i>	<i>Maxomys whiteheadi</i>	<i>Sundamys muelleri</i>	<i>Calloscirius notatus</i>	<i>Tupaia sp.</i>
Cultivé	97	-	-	-	-	-
Naturel	2	4	1	14	3	9
Rural	13	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>9</b>

**Tableau 4. Espèces identifiées dans différents habitats à Irian Jaya et à Bangka.** Le nombre de capture total a été représenté pour chaque type d'habitat : cultivé (i.e. palmeraie), rural (i.e. village inclus dans la palmeraie), naturel (i.e. forêt adjacente à la palmeraie).

Une petite description des sept espèces endémiques est présentée ci-dessous, à partir des descriptions de Myers *et al.* (2012) et de Wilson & Reeder (2005).

Espèces d'Irian Jaya :

- *Hydromys sp.* (Geoffroy, 1804) sont des rats aquatiques appartenant à la famille des muridés. Ils sont endémiques de l'Australie et de la Paouasie-Nouvelle Guinée (île d'Irian Jaya). Les spécimens capturés dans cette étude sont tous issus de zone irriguée par un cours d'eau. Leur poids moyen est de 358,6g  $\pm$ 78,2 compris entre 246g et 447g. La longueur de la queue [21 cm ; 24,5 cm], à l'extrémité blanche, est plus courte que la longueur du corps [23,1 cm ; 27,8 cm], avec un rapport moyen « longueur corps/longueur queue » de 1,12  $\pm$ 0,02 cm.
- Le péramèle roux *Echymipera Rufescens* (Peters & Doria, 1875) est une espèce de marsupial bandicoot endémique du nord de l'Australie, de l'île de la Papouasie-Nouvelle Guinée et des îles orientales de l'Indonésie. C'est un animal qui occupe des milieux forestiers variés (forêts tropicales humides, forêts semi-sempervirentes, forêts galeries et forêts ouvertes). Sa présence pourrait être associée avec des zones de lisières (Westerman *et al.* 2012). Les trois individus analysés avaient des morphométries [poids (g) /longueur du corps (cm)/longueur de la queue (cm)] de : [109/16/4,2], [518/28/7,4], [497/27/22,5]. Deux de ces individus ont été capturés en habitat cultivé.
- Espèce forestière non identifiée. L'identification moléculaire par la méthode du barcoding l'associe à 88% à la Souris du pays des lacs *Leggadina lakedownensis* (Watts, 1976), une espèce de muriné endémique de l'Australie, via la base de données Genbank. Cependant, l'identification ne correspond pas avec nos spécimens.

### Espèces de Bangka :

- *Niviventer cremoriventer* (Miller, 1900) est une espèce de muridé endémique du Sud-Est asiatique (Indonésie, Thaïlande, péninsule malaisienne). C'est une espèce arboricole qui vit exclusivement dans les habitats forestiers, dans les forêts primaires ou secondaires. Elle est classée vulnérable sur la liste rouge de l'IUCN (IUCN 2012).
- Le rat épineux à tête blanche *Maxomys whiteheadi* (Thomas, 1894) est une espèce de muridé originaire du sud-est asiatique (Indonésie, Thaïlande, péninsule malaisienne). C'est une espèce terrestre forestière, qui occupe également des forêts déboisées et des milieux agricoles (e.g. rizières) (Maryanto *et al.* 2000). Deux clades ont été identifiés, un premier à Bornéo, et un second regroupé à Sumatra et sur la péninsule malaisienne (Gorog *et al.* 2004). Elle est classée vulnérable sur la liste rouge de l'IUCN (IUCN 2012).
- Le rat géant de Müller, *Sundamys muelleri* (Jentink, 1879) est une espèce de muridé originaire du sud-est asiatique, incluant l'Indonésie. C'est une espèce principalement terrestre qui vit dans les forêts primaires ou secondaires.
- *Calloscirus notatus* (Boddaert, 1785) est une espèce de sciuridé originaire du sud-est asiatique. C'est un type d'écureuil arboricole.
- *Tupaia sp.* (Raffles, 1821) est une famille de Tupaiidae de la péninsule du Sud-Est asiatique. Elle regroupe des espèces de musaraignes arboricoles qui occupent des habitats forestiers.

L'identification obtenue est à modérer étant donné la difficulté de déterminer de manière précise une espèce avec des critères morphologiques. Bien que certains individus aient été analysés par une approche moléculaire, il est préférable d'utiliser ces résultats préliminaires avec parcimonie. A Irian Jaya, les identifications moléculaires sont peu fiables pour le paramèle roux et la souris du pays des lacs.

### **Présence en habitat naturel**

Au total, quinze et trente-trois micromammifères ont respectivement été capturés dans des habitats de forêt primaire à Irian Jaya et de forêt type « forêt de plaine » à Bangka (Tableau 4). Seulement deux individus appartenant au *Rattus tanezumi-R3* ont été enregistrés dans les forêts de Bangka. Aucun autre individu des espèces invasives des palmeraies (i.e. *R. tiomanicus* et *R. tanezumi-R3*) n'a été identifié dans ces habitats naturels pourtant attenants, parfois enclavés dans l'habitat agricole. Toutes les espèces identifiées, excepté les deux *rattus*, sont des espèces endémiques des forêts échantillonnées.

### **Présence en habitat rural**

Tous les animaux piégés dans les villages de Bangka (n=13) et d'Irian Jaya (n=29) appartiennent à l'espèce invasive des plantations *Rattus tanezumi-R3*, excepté un individu identifié *Echymipera Rufescens*, marsupial endémique d'Irian Jaya.

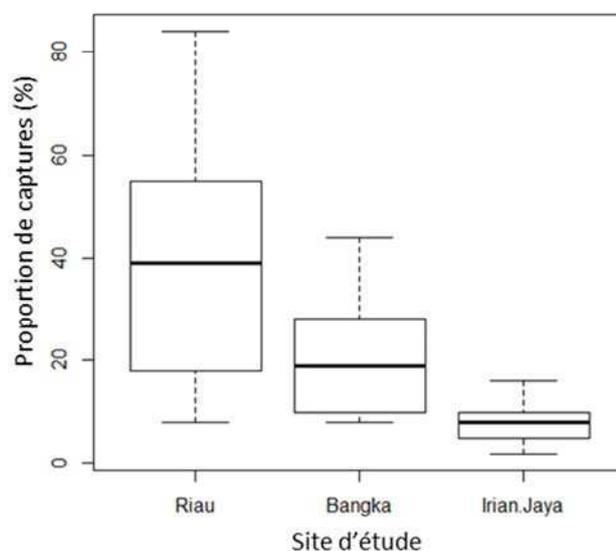
Un autre échantillonnage a été réalisé dans un grand village situé non loin de la plantation de Riau, mais entouré de grandes plantations de milliers d'hectares. Trente-deux rongeurs ont été récoltés et identifiés *Rattus tanezummi-R3*. Or les rongeurs invasifs des plantations du site de Riau sont principalement des *Rattus tiomanicus* (cf. partie III.1.1).

### **Présence en habitat cultivé**

Seulement quelques spécimens d'espèces forestières d'Irian Jaya ont également été capturés en habitat cultivé. A l'inverse, aucune espèce forestière n'a été piégée dans les habitats cultivés à Bangka, bien que des écureuils *callosciurus sp.* aient été observés dans les palmeraies. A Riau, seuls des *Rattus tiomanicus* et des *Rattus tanzumi-R3* ont été piégés.

### Proportions de capture en habitat cultivé

Les proportions de capture calculées correspondent au nombre de pièges ayant capturé un rat pendant une nuit de piégeage. Ces proportions sont relativement faibles à Irian Jaya avec une moyenne de 8,11%, un minimum de 2%, et un maximum de 16%, d'animaux capturés par session de piégeage. Le pourcentage moyen des captures à Bangka est de 19,40% avec une plus grande variabilité bornée par un minimum 8% et un maximum 44%. Les taux les plus élevés ont été enregistrés à Riau avec un pourcentage moyen de 37,75% de rats capturés par session, et une grande variabilité de 8% à 84% de capture par session (Figure 27).

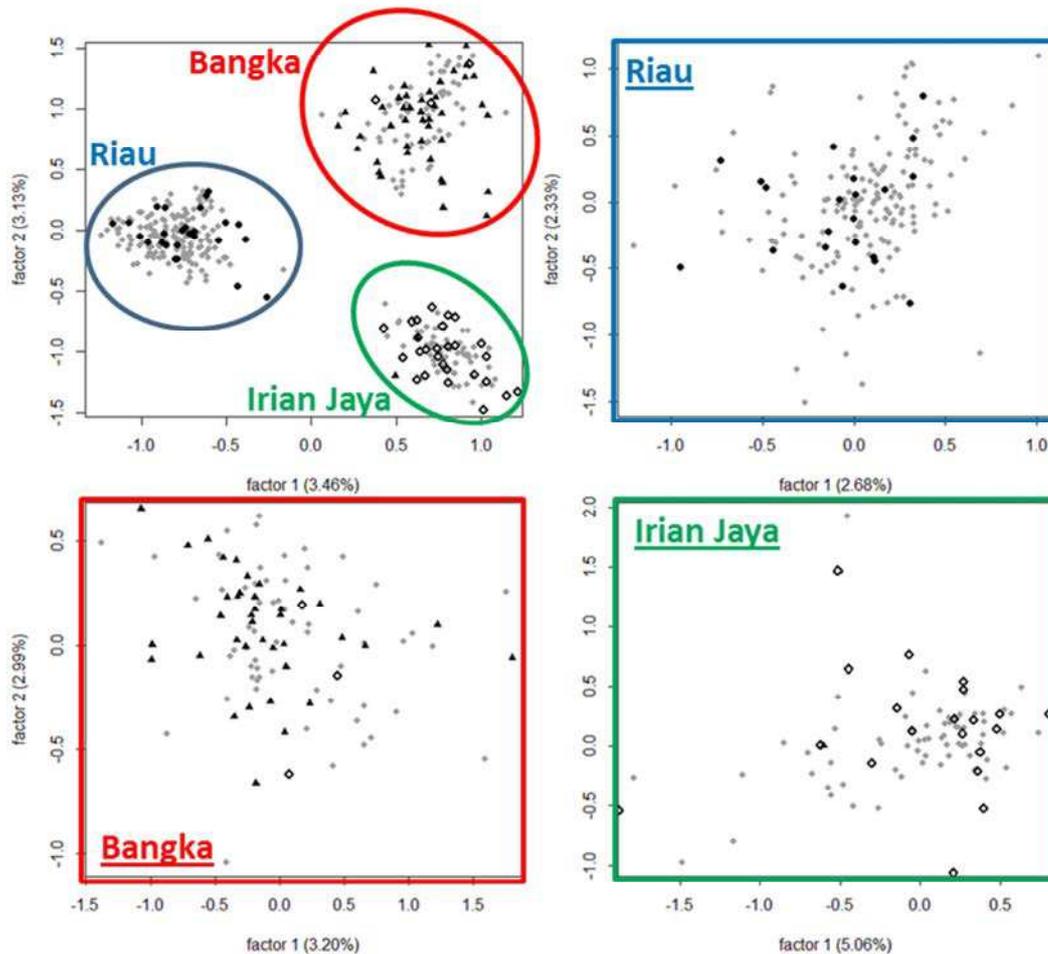


**Figure 27. Représentation des proportions de captures** par session de piégeage, dans les habitats cultivés de Riau, Bangka et Irian Jaya.

### III.2.2. STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS DANS UNE PALMERAIE

A Riau, vingt-six individus ont été identifiés *Rattus tiomanicus* et un individu *Rattus tanezumi* qui a été retiré de l'analyse génétique. A Bangka, trois *Rattus tanezumi* et quarante-cinq *Rattus R3*, et à Irian Jaya vingt-sept *Rattus tanezumi* et deux *Rattus R3* ont été identifiés par barcoding. Pour chaque site, l'analyse factorielle des correspondances indique que tous les

individus appartiennent à la même espèce : *Rattus tiomanicus* à Riau (n=179), et *Rattus tanezumi-R3* à Bangka (n=108) et à Irian Jaya (n=89). Les individus de Bangka et d'Irian Jaya appartiennent à la même espèce mais forment deux groupes génétiquement différents (Figure 28).



**Figure 28. Représentation graphique de l'analyse factorielle des correspondances (AFC)** sur l'ensemble des individus dans l'ensemble des trois sites (A) puis intra-site dans des cadres de différentes couleurs (B) (Riau en bleu ; Bangka en rouge ; Irian Jaya en vert). Graphiques 2D sur les deux premiers axes, le troisième axe n'étant pas informatif pour le regroupement des individus. Les ronds gris représentent les individus n'ayant pas été identifiés par barcoding, les ronds noirs représentent les individus identifiés *Rattus tiomanicus*, les triangles noirs représentent les individus identifiés *Rattus R3* et les losanges les individus identifiés *Rattus tanezumi*.

L'estimation des  $F_{ST}$  non biaisés indique un déficit d'hétérozygotes modéré ( $0,05 < F_{ST} < 0,15$ ) et donc une différenciation modérée entre chaque paire de site (Wright 1978). Trois

niveaux de différenciation sont observés (Tableau 5). La population d'Irian Jaya est plus différenciée de celle de Riau ( $F_{ST} = 0.10$ ) que de celle de Bangka ( $F_{ST} = 0.08$ ). Riau et Bangka sont les moins différenciées ( $F_{ST} = 0.06$ ).

Localité	Riau	Irian Jaya
Riau	-	-
Irian Jaya	0.10	-
Bangka	0.06	0.08

**Tableau 5. Valeur des  $F_{ST}$  entre chaque paire de localités**, obtenus avec FreeNA (méthode ENA)

### Structure génétique des populations

Les richesses alléliques sont plus faibles à Irian Jaya ( $R_{S_{Irian}} = 8,35 \pm 2,26$ ) que dans les deux autres sites ( $R_{S_{Bangka}} = 13,79 \pm 2,11$  ;  $R_{S_{Riau}} = 13,35 \pm 3,9$ ) (Tableau 6). La probabilité d'allèles nuls est modérée pour chaque loci de chaque site ( $r$  maximum = 0.23) (Annexe II). Tous les loci ont donc été conservés pour les analyses de structure génétique des populations. Dans chaque site les populations ne sont significativement pas à l'équilibre d'Hardy-Weinberg ( $p \leq 0.01$ ), avec un déficit d'hétérozygotie. Les résultats détaillés pour chaque loci sont présentés en Annexe II.

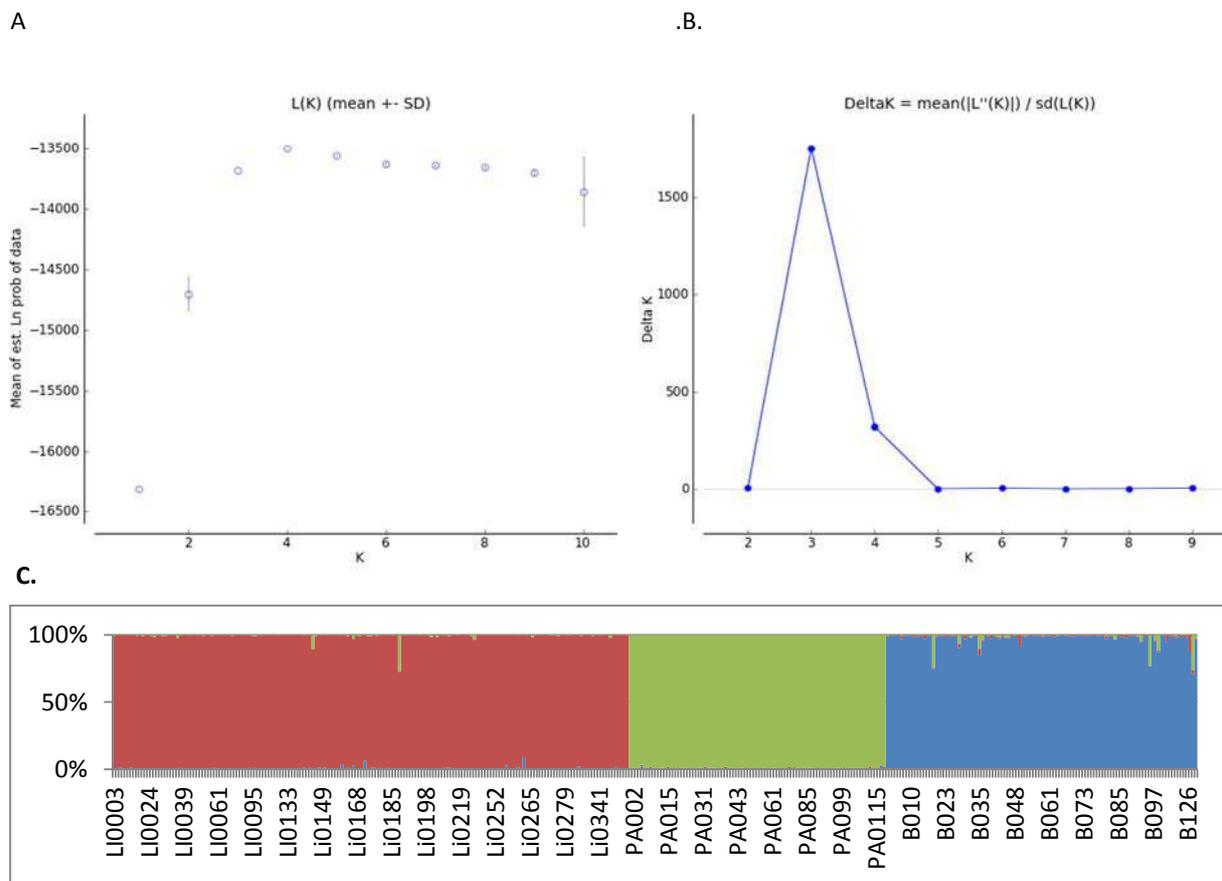
Localité	N	Na	Rs	He	Ho	HWE
Riau	179	20,43 ± 9,18	13,35 ± 3,9	0,88 ± 0,04	0,75 ± 0,12	high.sign.
Bangka	108	20,28 ± 4,15	13,79 ± 2,11	0,89 ± 0,02	0,76 ± 0,20	high.sign.
Irian Jaya	89	11,28 ± 3,77	8,35 ± 2,26	0,76 ± 0,10	0,68 ± 0,11	high.sign.

**Tableau 6. Statistiques de base pour les trois populations de Rattus.** N, nombre d'individus ; Na, nombre d'allèle moyen par locus ; Rs, richesse allélique moyenne par locus ; He, hétérozygotie attendue non biaisée; Ho, hétérozygotie observée ; HWE, résultat du test multilocus à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. « high. Sign. » : très significatif

Les analyses bayésiennes réalisées avec le logiciel STRUCTURE pour l'ensemble des sites indique une structure en trois populations distinctes. Cette probabilité est confirmée par les corrections effectuées avec l'outil internet « Structure Harvester ». L'ensemble des 100

assignations pour  $K=3$  est unimodale et sépare distinctement les individus en fonctions de leur origine géographique (Figure 29).

Les analyses bayésiennes réalisées indépendamment pour chaque site donnent des résultats similaires. Les résultats obtenus sous STRUCTURE indiquent une structure en une seule population pour chaque site. La correction d'Evanno ne peut pas être appliquée dans ce cas, car la méthode repose sur des calculs de différences  $\Delta K$  entre les valeurs de probabilités  $\ln \Pr(X|K)$  calculées pour un nombre de groupe inférieur  $\ln \Pr(X|K-1)$ . Aucune valeur  $\Delta K$  ne peut ainsi être obtenue pour  $K=1$  et les résultats sont biaisés, indiquant une probabilité de population structurée en trois groupes pour chacun des sites (Annexe III).



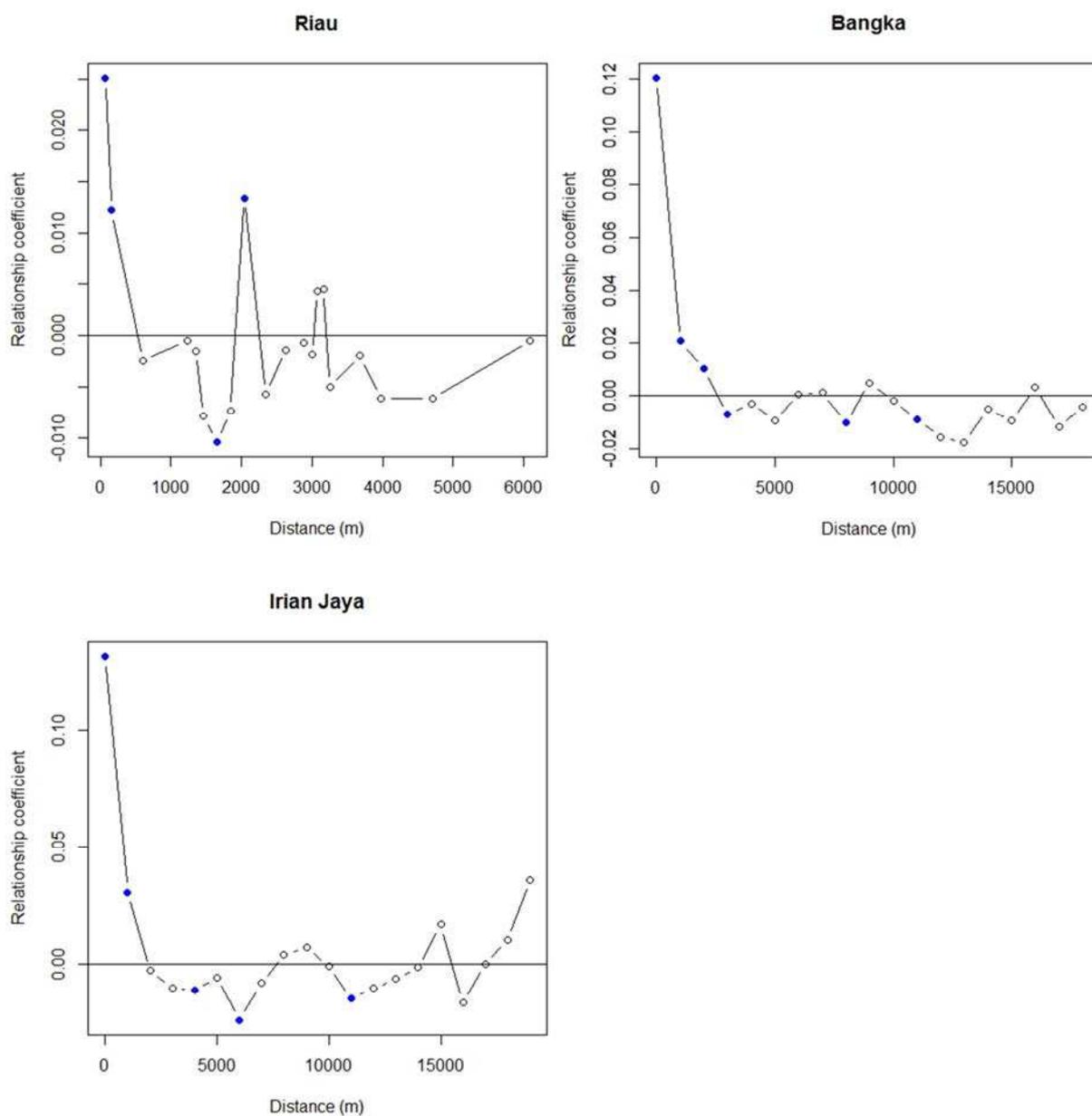
**Figure 29. Structure génétique des populations de rats échantillonnées** dans les trois plantations de palmiers à huile. Les probabilités obtenues sous STRUCTURE  $K=[1 ; 10]$  avec 100 itérations par  $K$  (A) ont été corrigés avec la méthode d'Evanno (B). Les modes d'assignation des individus dans  $K=3$  populations (le nombre de populations le plus probable) correspondent à 100% au mode (C). Chaque couleur correspond aux individus d'un site d'étude Riau (rouge), Irian Jaya (vert) et Bangka (bleu).

### Structure génétique spatiale des populations

Les autocorrélogrammes obtenus pour chaque site suivent un patron d'isolement par la distance (Figure 30). Le coefficient d'apparentement décroît avec l'augmentation de la distance géographique et atteint des valeurs significativement négatives à 1 651 mètres à Riau, 3 000 mètres à Bangka et 4 000 mètres à Irian Jaya. Les patrons de structure génétique spatiale sont similaires à Bangka et à Irian Jaya.

Le patron de structure génétique spatiale est légèrement différent à Riau. Dans ce site, le coefficient d'apparentement interindividuel décroît rapidement avec l'augmentation de la

distance géographique, avec des valeurs négatives à partir d'une gamme de distances inférieures aux deux autres sites. Une valeur significativement positive est observée dans la classe de distance de [1 841 ; 2040] mètres et suggère un fort taux d'appariement entre des individus situés dans cet intervalle.



**Figure 30** Corrélogrammes de l'estimateur du coefficient d'apparement entre individus (Loiselle *et al.* 1995) en fonction de la distance. Les marques de couleur (bleu) représentent les écarts significatifs à l'hypothèse nulle qui considère une répartition géographique des géotypes aléatoire (intervalle de confiance à 95%).

### III.3. RESISTANCE AU COUMATETRALYL

#### III.3.1. RESISTANCE PHENOTYPIQUE AU COUMATETRALYL

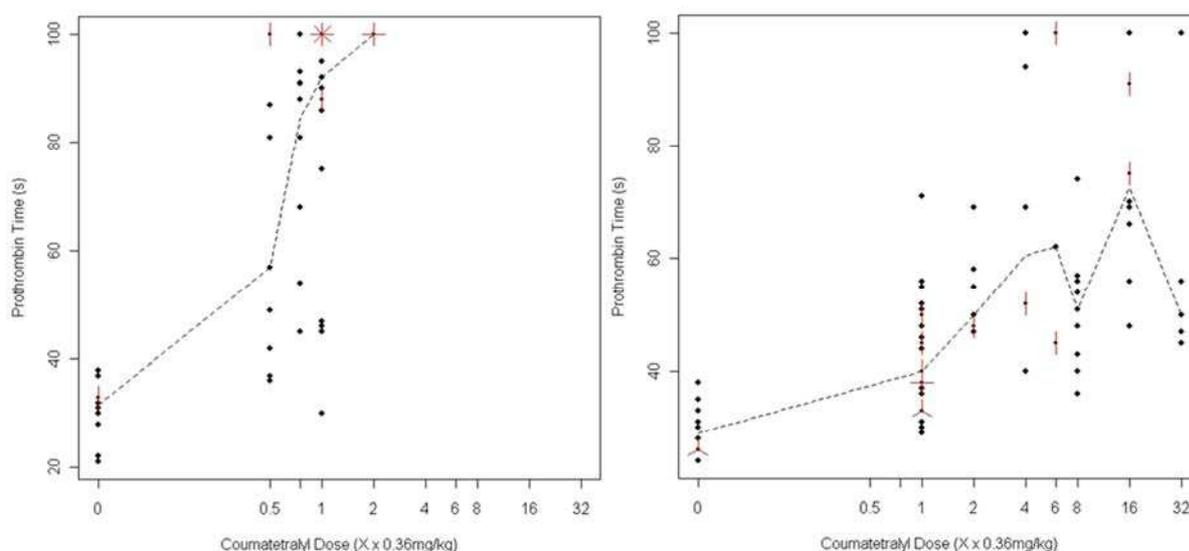
Les rongeurs utilisés dans les expériences de résistance au coumatétralyl (anticoagulant AVK) correspondent à deux espèces différentes. Les cinquante rats issus de la plantation de Riau, non traitée au coumatétralyl, ont tous été identifiés *Rattus tiomanicus*, alors que les soixante-dix-huit rats capturés dans la région de Bangka, traitée au coumatétralyl, ont été identifiés comme appartenant au clade *Rattus tanezumi/R3*. Les analyses du gène mitochondrial CO1 ont confirmé ces résultats pour tous les rats génotypés (n = 19 rats de Riau, n = 36 rats de Bangka).

#### **Riau**

Dans la région de Riau, plantation non traitée, la médiane du temps de coagulation basal (PT<sub>0</sub>) mesuré chez le groupe de rats témoin (i.e. sans injection de coumatétralyl) est de 31.5 [21-38] secondes avec une faible variabilité inter-individuelle (Figure 31). Pour chaque groupe expérimental l'injection intra-péritonéale de coumatétralyl augmente la valeur médiane du PT ainsi que la variabilité intra-groupe. Plus la concentration de coumatétralyl est importante, plus la valeur médiane du PT intra-groupe augmente (PT<sub>0.5</sub>= 57; PT<sub>0.75</sub>= 84.5; PT<sub>1</sub>=92, PT<sub>2</sub>=100). Le PT est fortement augmenté pour plus de la moitié des animaux du groupe ayant subi une injection de coumatétralyl d'une concentration correspondant à une fois la dose de référence (1 x ED<sub>50Rn</sub>). Parmi les 19 individus de ce groupe, 15 ont un PT très élevé (>75 secondes) alors que 4 individus maintiennent une faible valeur de PT, proche de la valeur basale, et ne semblent pas affecté par l'AVK. Pour chaque groupe exposé à des concentrations plus importantes (>ED<sub>50Rn</sub>), la moitié des individus répondent positivement (PT>75 secondes). Tous les individus du groupe exposé à une concentration de coumatétralyl de 2 x ED<sub>50Rn</sub> ont un PT très élevé (PT = 100 secondes). L'ED<sub>50</sub> de la population de *Rattus tiomanicus* de Riau est similaire à l'ED<sub>50Rn</sub> obtenu pour les lignées sensibles de *Rattus norvegicus*.

## Bangka

Dans la région de Bangka, plantation systématiquement traitée, la valeur médiane du PT basal est de 29 [24-38] secondes (Figure 31). L'injection de coumatétralyl augmente la valeur médiane du PT pour chaque groupe expérimental. Cependant cette augmentation est moins marquée que pour la population de Riau. Le PT est légèrement augmenté pour le groupe d'individus exposés à la dose de référence ( $1 \times ED_{50Rn}$ ) avec une valeur médiane ( $PT_1=40$  secondes) proche de la valeur basale. De fortes valeurs de PT ( $>75$  secondes) ont été observées pour certains individus des groupes exposés à une concentration de coumatétralyl supérieure ou égale à  $4 \times ED_{50Rn}$ . Cependant, l'effet sur le groupe reste modéré avec des valeurs médianes de PT comprises entre 50 et 72,5 secondes, même à une concentration très importante de coumatétralyl de  $32 \times ED_{50Rn}$ .



**Figure 31. Réponse phénotypique au coumatétralyl.** Le graphique de gauche correspond à Riau, site non traité aux coumatétralyl. Le graphique de droite correspond à Bangka, site exposé au coumatétralyl. Chaque ● représente la réponse enregistré pour un individu 24h après l'injection intrapéritonéale. Les points multiples ont été représentés avec la fonction 'sunflower' sous le logiciel R. Chaque 'pétale' représente un point superposé. Une échelle logarithmique a été utilisée pour une meilleure comparaison des deux sites.

### Comparaison des deux sites

Le PT basal est similaire pour la population de *Rattus tiomanicus* de Riau et la population du clade *Rattus tanezumi/R3* de Bangka (test non paramétrique de Wilcoxon, ns :  $p=0,62$ ). Cependant l'effet mesuré après une injection d'une fois la dose de référence de coumatétralyl (1 x ED50Rn) est significativement différent pour les deux populations (test non paramétrique de Wilcoxon, \*\*\* :  $p < 0,001$ ). Dans l'ensemble, la population de *Rattus tanezumi/R3* est moins affectée par le coumatétralyl que population de *Rattus tiomanicus* de Riau.

---

### III.3.2. POLYMORPHISME GENETIQUE DE *VKORC1*

Fort de ce constat (cf. partie III.3.2) établi par l'exploitation des données fournies par l'analyse de terrain, il est apparu pertinent d'étudier le polymorphisme génétique de *vkorc1* chez ces populations. Une mutation de ce gène pourrait être à l'origine de la résistance phénotypique aux AVK observée à Bangka.

Les séquences du gène *vkorc1* ont été alignées avec la séquence consensus d'un *Rattus norvegicus* issu d'une lignée sensible aux AVK. L'analyse de l'exon 3, une région sensible pour les mutations conférant la résistance aux AVK, a révélé plusieurs mutations SNP. Deux mutations silencieuses, I107I et T137T, sont communes aux rats des régions de Riau et de Bangka. Deux autres mutations ont été observées chez les rats de Bangka : le remplacement d'une alanine par une valine en position 143 pour 53% des individus génotypés (dont 44% étaient homozygotes et 56% hétérozygotes), et une mutation silencieuse S103S qui semble associée à la mutation A143V (Tableau 7). Cependant, la comparaison des valeurs de PT avec les mutations de *vkorc1* ne révèle aucune association claire entre les phénotypes de résistances et les SNP observés. Les individus portant la mutation de substitution A143V, homozygotes ou hétérozygotes, ont des PT aussi bien plus élevés que plus faibles que ceux des individus portant l'haplotype sauvage (non muté).

Concentration of coumatetralyl injected (X x 0.36mg/kg)	Prothrombin time (seconds)	Coumatetralyl susceptibility phenotype	Amino acid substitutions	Silent mutations
<b>a</b>				
0.75	93	+	-	-
0.75	45	-	-	-
1	100	+	-	-
1	100	+	-	-
1	100	+	-	-
1	100	+	-	-
1	100	+	-	-
1	92	+	-	-
1	75	+	-	-
1	46	-	-	-
1	45	-	-	-
1	30	-	-	-
2	100	+	-	-
<b>b</b>				
1	55	-	A143V*	S103S*
1	38	-	A143V	S103S
1	38	-	-	-
4	100	+	-	-
6	100	+	A143V	S103S
6	100	+	-	-
6	45	-	A143V*	S103S*
8	48	-	-	-
8	36	-	A143V	S103S
16	91	+	A143V*	-
16	56	-	-	-
16	48	-	-	-
32	100	+	-	-
32	56	-	-	-
32	50	-	A143V*	S103S
32	47	-	A143V*	S103S*
32	45	-	A143V	S103S

**Tableau 7 Réponse phénotypique au coumatétralyl et mutations de l'exon 3 du gène *vkorc1*.** Résultats obtenus chez *Rattus tiomanicus* (n=13) du site de Riau (a) et pour *Rattus tanezumi-R3* (n=17) de Bangka (b).

+ Animal sensible à la dose injectée (i.e. PT > 75 sec)

- Animal résistant à la dose injectée (i.e. PT < 75 sec)

\* Animal hétérozygote pour la mutation

Pour écarter définitivement l'implication d'une mutation de l'enzyme cible à l'origine du mécanisme de résistance observé à Bangka, la totalité du gène *vkorc1* a été analysés pour huit rats de chaque site, choisis selon leur réponse phénotypique (i.e. forte tolérance et forte sensibilité). L'analyse des exons 1 et 2 a ainsi permis de mettre en évidence d'autres

mutations SNP (Tableau 8). La plupart de ces mutations sont silencieuses, telle que R12R, H68H, I107I, T137T. Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences consensus des deux autres espèces de rats, afin de caractériser les mutations observées.

La mutation R12R a également été observée chez *Rattus rattus alexandrinus* en Afrique (Uganda, Diaz *et al.* 2010), alors que la mutation L15L a été observée uniquement chez *Rattus tanezumi/R3* de la région de Bangka. Cependant la mutation substitutive I90L de l'exon 2 a été observée chez toutes les espèces de l'analyse. Dans la littérature, cette mutation a été identifiée chez de nombreuses autres espèces, telles que *Rattus losea*, *Rattus rattus alexandrinus*, *Mus musculus* et *Homo sapiens*, et serait très probablement une mutation ancestrale (Rost *et al.* 2009).

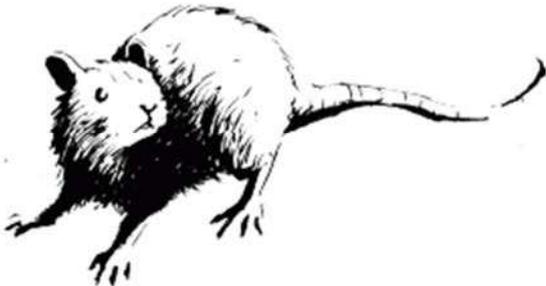
	<i>Rattus tiomanicus</i>	<i>Rattus tanezumi/R3</i>	<i>Rattus losea</i> (Wang 2008)	<i>Rattus rattus alexandrinus</i> (Diaz 2010)
Exon 1 <i>vkorc1</i>	R12R	R12R L15L		R12R
Exon 2 <i>vkorc1</i>	<b>I90L</b> H68H	<b>I90L</b> H68H	<b>I90L</b>	<b>I90L</b>
Exon 3 <i>vkorc1</i>	I107I T137T	S103S (53%) I107I T137T <b>A143V (53%)</b>		

**Tableau 8 Mutations SNP identifiées chez *Rattus tiomanicus*, *Rattus tanezumi-R3*, et d'autres espèces de *Rattus*.** Comparaison avec la séquence consensus de *Rattus norvegicus* (ENSRNOT00000026347). Les mutations de substitutions d'acides aminés sont en caractères gras et les mutations silencieuses en caractères standards.

Les niveaux de polymorphisme de *vkorc1* sont faibles chez les deux espèces étudiées et aucun SNP identifié ne semble associé à la sensibilité au coumatétralyl.



DISCUSSION





## IV. DISCUSSION

---

### IV.1. CARACTERISATION DES ESPECES ET DE LEUR DISTRIBUTION

---

#### IV.1.1. IDENTIFICATION DES ESPECES

---

L'identification précise des espèces ciblées dans la lutte anti-nuisibles est à la base du développement d'une lutte adaptée. Des études ont démontré que l'identification basée sur les critères morphologiques sont souvent erronées chez les espèces de rats du Sud-Est asiatique étant donné leur grande similitude (Robins *et al.* 2007; Pagès *et al.* 2010). Ainsi, Robins *et al.* (2007) rapportent que « de nombreuses espèces de *Rattus* sont difficiles à distinguer sur la base de critères morphologiques à la fois pour les spécialistes et les non spécialistes ». L'utilisation d'une méthode d'identification moléculaire basée sur l'analyse de l'ADN permet d'éviter les problèmes d'identification.

La méthode d'identification moléculaire utilisée dans ce présent travail était le barcoding qui est basé sur l'analyse du gène mitochondrial CO1 (Hebert *et al.* 2003). Elle a permis d'identifier au total sept espèces de rongeurs occupant les plantations de palmier à huile en Indonésie. Parmi ces espèces, quatre d'entre elles étaient des espèces forestières endémiques de l'Indonésie (*Sundamys muelleri*, *Maxomys whiteheadi*, *Echymipera rufescens*, et une espèce non identifiée d'Irian Jaya), dont la présence semble occasionnelle et dépendante des milieux forestiers adjacents. Toutes ces espèces occupent habituellement des forêts primaires ou secondaires partiellement dégradées (Myers *et al.* 2012 ; Wilson & Reeder 2005). L'espèce *M. whiteheadi* a déjà été détectée dans des rizières entourées de forêt en Indonésie (Maryanto *et al.* 2000). Toutefois, l'inventaire d'espèces réalisé dans l'ensemble des 24 plantations de palmiers à huile est très succinct. Il relève donc de la plus haute prudence dans l'interprétation des résultats. En effet, la détection d'une espèce signifie bien qu'elle est présente, mais à l'inverse la non détection ne signifie pas que l'espèce est absente mais simplement qu'elle n'a pas été détectée (Kéry 2011). Il convient donc de discuter uniquement des espèces détectées.

Les résultats de l'étude ont également permis de répertorier trois espèces de rats communes aux milieux agricoles : *Rattus tiomanicus*, *Rattus tanezumi-R3* et *Rattus argentiventer*. Ce dernier est généralement ravageur des rizières et des plantations de palmiers à huile immatures (Wood & Fee 2003). Peu de spécimens *Rattus argentiventer* ont été collectés et sa présence était probablement liée à des rizières avoisinantes, ou à des pépinières et à des plantations de jeunes palmiers situées à proximité des sites de capture. *Rattus tiomanicus* et *Rattus tanezumi-R3* ont été les deux espèces de rongeurs principalement détectées dans les plantations de palmier à huile matures en Indonésie. Ces résultats corroborent ceux obtenus précédemment en Malaisie (Wood & Fee 2003 ; Hafidzi & Saayon 2001). Ces deux espèces ont parfois été observées en sympatrie avec des proportions importantes pour au moins une des deux espèces (un maximum de 20% pour l'espèce minoritaire).

Ces résultats évoquent l'hypothèse d'une compétition interspécifique exclusive entre *Rattus tiomanicus* et *Rattus tanezumi-R3*. Des études précédentes ont montré que ces deux espèces occupent des habitats similaires et sont mutuellement incompatibles (Maryanto *et al.* 2000; Corbet & Hill 1992 in Maryanto *et al.* 2000). De plus, il a précédemment été observé un remarquable phénomène de remplacement d'une population de *Rattus tiomanicus* par *Rattus tanezumi-R3* dans les plantations de palmier à huile en Malaisie (Wood *et al.* 1988 in Wood & Fee 2003). Les études antérieures menées en Malaisie ont montré que *Rattus tiomanicus* était l'espèce inféodée aux plantations de palmiers à huile, et que depuis 1983 *Rattus tanezumi-R3* a commencé à envahir ces milieux où il est devenu commun (Wood & Fee 2003).

Une seconde hypothèse expliquant ces relations de dominance apparente repose sur les résultats inclus dans cette thèse (cf. partie III.3) qui démontrent que *Rattus tanezumi-R3* développe une résistance physiologique importante aux pressions d'AVK. Cette deuxième hypothèse se base sur le fait que les deux espèces ne répondent pas de la même façon aux pesticides. *Rattus tiomanicus* serait moins adapté à cette pression chimique que *Rattus tanezumi-R3*. Ainsi, l'utilisation des AVK contre-sélectionnerait *Rattus tiomanicus* et favoriserait l'établissement de populations de *Rattus tanezumi-R3*. Cette hypothèse a été

soulevée par Wood et Fee (2003), lorsqu'ils ont observé le remplacement de populations *Rattus tiomanicus* par des populations *Rattus tanezumi-R3*.

---

#### IV.1.2. EFFETS DE L'ENVIRONNEMENT SUR LA DISTRIBUTION DES ESPECES PREDOMINANTES

La distribution géographique de ces deux espèces semble varier selon un cline longitudinal. *Rattus tiomanicus* est plus abondant à l'Ouest, alors que *Rattus tanezumi-R3* est plus abondant à l'Est du pays.

L'analyse corrélatrice a mis en évidence l'association de *Rattus tiomanicus* avec la présence d'habitats naturels ouverts et arbustifs, qui est son habitat d'origine, et la présence d'habitats cultivés, qui correspondent à des habitats d'invasion. Ces résultats s'accordent avec les connaissances actuelles sur cette espèce. Plusieurs travaux montrent qu'elle est naturellement présente dans les forêts secondaires et les habitats arbustifs (Myers *et al.* 2012 ; Wilson & Reeder 2005 ; Numata *et al.* 2003). D'autres travaux montrent qu'elle a également envahi des habitats agricoles comme les plantations de palmiers à huile (Buckle *et al.* 1997; Aplin *et al.* 2003), sans pour autant s'établir à proximité de l'homme (e.g. villes) (Aplin *et al.* 2011). Elle n'a pas été retrouvée dans les villages de nos sites d'étude (cf. partie IV.2.1.).

A l'inverse, l'abondance relative de *Rattus tanezumi-R3* est associée à une gamme d'habitats variables, correspondant à la fois à des forêts primaires et à des zones inondées d'eau salées. *Rattus tanezumi-R3* est une espèce originaire du Sud-Est asiatique (Malaisie, Vietnam, Cambodge...) qui a été introduite en Indonésie. Elle a été recensée dans de nombreux habitats anthropiques et en forêt d'altitude (Salibay & Luyon 2008 ; Rickart *et al.* 2011), mais son habitat naturel est incertain.

D'une part, il est important de préciser que les résultats de l'analyse corrélatrice ont révélé une association entre l'abondance relative de l'espèce et les habitats naturels des zones tampons des sites échantillonnés (e.g. mer à Bangka). Cette association ne signifie pas que cette espèce occupe ces habitats. En effet, Irian Jaya est caractérisée par de grandes étendues de forêts

primaires et Bangka est une petite île, donc entourée d'eau salée. Il est envisageable que l'abondance de cette espèce ne soit pas associée à un habitat naturel particulier, d'autant plus qu'elle n'a pas été détectée dans les forêts primaires d'Irian Jaya (cf. partie III.2.1.).

D'autre part, l'abondance relative de cette espèce est fortement associée aux facteurs anthropiques. Ces résultats soulèvent l'hypothèse que l'abondance relative de *Rattus tanezumi-R3* est principalement liée aux activités humaines, permettant son introduction dans des sites aux habitats adjacents variés. Une étude intéressante a mis en évidence la présence de cette espèce en Afrique du Sud, région qui ne correspond pas aux conditions environnementales de son aire d'origine, d'après une modélisation avec le logiciel Maxent (Bastos *et al.* 2011).

Une hypothèse simple découle de l'ensemble de ces observations : *Rattus tiomanicus* envahirait les plantations à partir d'environnement adjacents où elle est naturellement présente (à l'Ouest du pays), alors que *Rattus tanezumi-R3* envahirait toutes les plantations où elle peut être introduite par l'être humain. Cette hypothèse s'appuie sur les résultats qui suggèrent que la présence de *Rattus tanezumi-R3* ne dépendrait pas des caractéristiques environnementales, mais serait associée à la présence humaine et envahirait les milieux qui lui sont associés, comme les milieux agricoles.

Une autre hypothèse basée sur l'histoire phylogéographique de ces espèces permettrait d'expliquer le patron de distribution géographique observé. En effet, *Rattus tiomanicus* est une espèce endémique de la partie Ouest de l'Indonésie (plateau continental de Sunda), alors que *Rattus tanezumi-R3* est originaire d'une vaste région au Nord-Ouest de l'Indonésie (Aplin *et al.* 2011).

Il a été démontré que l'abondance de *Rattus tanezumi-R3* augmente avec le niveau de perturbation des habitats naturels par l'homme (Salibay & Luyon 2008). De nombreuses études concernant des modèles d'étude variées ont mis en évidence des routes de colonisation similaires dans le sud-est asiatique : depuis la région native de la lignée de *Rattus tanezumi-R3*, au sud-est de la Chine, vers la Papouasie-Nouvelle Guinée. Ces études concernent entre

autre la colonisation du rat du Pacifique *Rattus exulans*, ainsi que celle du cochon domestique, dans les îles polynésiennes par l'intermédiaire de l'homme (Matisoo-Smith & Robins 2004 ; Lum *et al.* 2006). Une autre étude anthropologique sur le langage montre une voie d'invasion identique (Gray *et al.* 2009). Il est envisageable que *Rattus tanezumi-R3* ait suivi des voies d'invasions similaires, envahissant l'Indonésie à l'Ouest puis à l'Est. Cette hypothèse a été illustrée récemment pour *Rattus tanezumi-R3* (Aplin *et al.* 2011).

Cependant, cette seule hypothèse ne suffit pas à expliquer pourquoi *R. tiomanicus* n'est pas l'espèce prédominante de toutes les plantations situées dans son aire native (e.g. Bornéo). Il semble judicieux d'envisager que le patron de distribution observé est d'une part lié à l'histoire phylogéographique des espèces, liée au commensalisme de *Rattus tanezumi-R3*, ainsi qu'à des phénomènes de compétition interspécifiques.

Suite à la discussion développée dans la partie IV.1.1., qui suggère que la lutte chimique a un effet sur la prédominance des espèces dans les palmeraies, il serait intéressant d'intégrer les paramètres de gestion par AVK (intensité, fréquence, historique) dans l'analyse corrélative afin d'évaluer l'influence de cette pression anthropique sur l'abondance relative des espèces.

## IV.2. DISPERSION SPATIALE DES POPULATIONS INVASIVES

### IV.2.1. OCCUPATION DES HABITATS D'UNE PALMERAIE

L'étude préliminaire réalisée dans les différents habitats des plantations de palmiers à huile donnent des indications intéressantes sur l'occupation de l'espace par les populations invasives de rongeurs.

Les résultats de l'échantillonnage préliminaire réalisé dans les habitats naturels adjacents des palmeraies, ainsi que dans les villages enclavés à l'intérieur des plantations de palmiers, ont donné des résultats similaires dans les deux sites. Pourtant, les sites d'Irian Jaya et de Bangka ont des caractéristiques écologiques très différentes et sont très éloignés géographiquement. Les résultats coïncident car, les rongeurs invasifs ont été détectés dans tous les villages, mais n'ont quasiment pas été détectés dans les habitats naturels, où des espèces endémiques ont été identifiées.

Les données suggèrent que dans les deux sites étudiés, les habitats forestiers pourraient constituer des barrières à la dispersion des *Rattus tanezumi-R3*. Cependant, les résultats obtenus à Bangka soulèvent la possibilité d'invasion de ces habitats par les populations de *Rattus tanezumi-R3*, car deux individus parmi les trente-trois piégés en forêt appartenaient à ce clade. Il est important de noter que le site de Bangka qui se situe dans une matrice très modifiée par les activités anthropiques, contrairement au site d'Irian Jaya est enclavé dans une grande matrice environnementale naturelle. Les forêts étudiées à Bangka sont des petits patches de quelques dizaines d'hectares entourés de plantations.

Tous les individus identifiés dans les villages appartiennent à ce clade, y compris dans le village près de la plantation de Riau où quelques individus de cette espèce ont été détectés dans la palmeraie prédominée par une population de *Rattus tiomanicus*. Il est judicieux de supposer que les villages constitueraient des foyers d'introduction, et que les transports routiers industriels et publics permettraient la dispersion de *Rattus tanezumi-R3*. Ces observations confortent l'hypothèse énoncée précédemment sur le processus d'invasion de cette espèce (cf. partie IV.1.2.).

La méthode utilisée dans cette étude ne permet pas de déterminer le statut de la population (i.e. établie ou invasive) au sein des palmeraies. Cependant, la technique de piégeage utilisée est similaire à celle mise au point par Wood (1984). Cet auteur a montré que les biais de détection sont faibles pour cette espèce occupant les palmeraies. L'étude des taux de capture permet donc d'intéressantes observations.

Les taux de captures en habitat cultivé sont très élevés à Riau et à Bangka, laissant supposer que les populations sont bien établies. Les populations semblent aussi plus denses à Riau qu'à Bangka. Cependant, l'échantillonnage a été réalisé pendant la saison des pluies à Riau (février-mai 2009) et pendant la saison sèche à Bangka (octobre 2010). Or, un échantillonnage similaire avait été réalisé à Bangka au mois de février 2009 (pour l'étude de la résistance aux AVK), pendant la période d'échantillonnage de Riau, avec des proportions de captures bien supérieures qu'à Riau, atteignant parfois 98%. Bien que les palmiers à huile fructifient tout au long de l'année, les variations saisonnières pourraient affecter les populations de rongeurs.

Les taux de captures sont beaucoup plus modérés à Irian Jaya (8,11%), site échantillonné pendant la saison sèche (juillet 2009), et supposent que la taille de la population est réduite. Cette faible densité pourrait être expliquée par une récente introduction de la population, dont l'établissement serait en cours. Néanmoins, il est envisageable que ces populations soient épisodiquement introduites par les transports humains, mais ne parviennent pas à s'établir. Ce dernier site est particulièrement isolé des milieux anthropiques, et l'accès aux plantations est difficile. Les flux de transports sont extrêmement faibles et pourraient limiter les événements d'introduction de *Rattus tanezumi-R3*. De plus, il est possible que ces populations entrent en compétition avec des espèces endémiques (*Echymipera Rufescens* et *Hydromys sp.*), qui ont été détectées dans les plantations et dans les villages. Ces phénomènes pourraient limiter l'établissement de *Rattus tanezumi-R3* dans les palmeraies d'Irian Jaya.

---

## IV.2.2. DISPERSION SPATIALE DANS LA PALMERAIE

### Structure génétique inter-sites

Les résultats indiquent que les populations de Riau, Bangka et Irian Jaya appartiennent à des espèces différentes : *Rattus tiomanicus* à Riau et *Rattus tanezumi-R3* à Bangka et Irian Jaya.

Les populations de Bangka et d'Irian Jaya sont génétiquement assez différentes ( $F_{ST} = 0.08$ ). Cette observation pourrait être liée à l'importante distance géographique qui sépare les deux sites. Les deux populations auraient ainsi évolué indépendamment et se seraient génétiquement différenciées par l'absence de flux de gènes entre les deux sites. Une autre explication pourrait concerner l'histoire évolutive de ces différents groupes. Les mitotypes (CO1) ont des proportions différentes entre les deux sites : forte proportion de *Rattus tanezumi* à Irian Jaya et de *Rattus R3* à Bangka. Ainsi, il est envisageable que ces deux populations, qui sont intégrées dans un même clade, soient à la limite de la spéciation, ou issues de populations ancestrales très différentes. Les marqueurs nucléaires n'ont pas permis de différencier ces deux clades échantillonnés dans des localités géographiquement proches, ce qui suggère qu'ils sont capables de s'hybrider.

Néanmoins, la population de Bangka est plus différenciée de celle d'Irian Jaya ( $F_{ST} = 0.08$ ) que de celle Riau constituée de *Rattus tiomanicus* ( $F_{ST} = 0.06$ ). Ce résultat est surprenant, car il suggère que ces deux espèces sont moins éloignées génétiquement que les deux populations de *Rattus tanezumi-R3*. Un individu identifié *Rattus tanezumi-R3* a été collecté à Riau et retiré des analyses, ce qui signifie que cette espèce est présente dans le site. Ces observations soulèvent l'hypothèse d'une éventuelle hybridation entre ces deux espèces.

Il semblerait que ces trois taxons (*tanezumi*, *R3*, *tiomanicus*) aient été interconnectés par le passé. Les espèces prédominantes des plantations de palmiers à huile appartiennent toutes au complexe *Rattus rattus* (Aplin *et al.* 2011) dont la taxonomie n'est toujours pas résolue.

### **Structure génétique spatialisée à l'échelle de la plantation**

Aucune population échantillonnée ne semble structurée en sous-population : les individus sont distribués de façon continue dans l'espace. La structure génétique des populations suit un patron d'isolement par la distance, ce qui signifie que la distance spatiale constitue une barrière au flux de gènes (i.e. à la reproduction). Les valeurs du coefficient d'apparentement sont significativement positives à de courtes distances. Puis elles décroissent rapidement pour atteindre des valeurs significativement négatives, avant de se stabiliser à des valeurs nulles pour de longues distances. Les valeurs nulles caractérisent un équilibre entre les processus de migration et de dérive génétique. Les distances de dispersions sont relativement faibles. Les apparentements sont significativement négatifs entre 1 000 et 3 000 mètres selon les sites. Des auteurs ont montré que le domaine vital de *Rattus tanezumi-R3* atteint 80 mètres de diamètre avec une moyenne de 30 mètres pour les mâles dans des populations denses, et semble augmenter dans des populations moins denses (Wood 1971 dans Wood & Fee 2003). D'autres auteurs ont mesuré un domaine vital de *Rattus tiomanicus* de 69 mètres de diamètre avec une moyenne de 46,48 mètre pour les mâles (Buckle *et al.* 1997). Pour ces deux espèces les mâles dispersent légèrement plus loin que les femelles.

Il est envisageable que ces grandes populations occupent un habitat homogène avec peu de pressions écologique (e.g. prédateurs, compétiteurs). En effet, elles sont relativement stables et ne semblent pas marquées par des cycles de pullulation (Wood & Fee 2003). Ces caractéristiques pourraient expliquer que les individus ne dispersent pas loin de leur domaine vital natal (Peakall *et al.* 2003). Ainsi pour chacun des sites, les populations ont une forte structure génétique locale et sont spatialement continues. Elles semblent étendues et intra-connectées par des flux de gènes intergénérationnels à longues distances.

Le fort taux d'homozygotes observé à **Riau** pourrait être lié à la méthode d'échantillonnage « en population ». Les rongeurs vivent généralement en grandes colonies et les individus échantillonnés sur une surface réduite peuvent appartenir à la même famille. La consanguinité est une caractéristique des structures familiales. Néanmoins, l'ensemble de la population de Riau n'est pas structurée en dème et suit un patron d'isolement par la distance. Les échanges de gènes sont donc fréquents, et considérant les taux de captures important, cette population

semble de grande taille. Cependant, il a été observé un fort taux d'appariement à une classe de distance de [1 841 ; 2040] mètres. Sur le site échantillonné, il existe deux villages distants d'environ 2 000 mètres qui sont interconnectés par les transports humains. L'« effet route » a déjà été observé chez des espèces (Trombulak & Frissell 2001). Il serait intéressant d'identifier les individus concernés par ce fort taux d'appariement à longue distance pour vérifier cette hypothèse.

La structure de la population d'**Irian Jaya** semble plus complexe. D'une part, il a été observé une faible diversité génétique par rapport aux autres sites. Cela peut s'expliquer par l'isolement géographique du site d'étude. Irian Jaya est une plantation isolée dans une matrice environnementale principalement constituée de grandes forêts primaires d'où n'est pas originaire *Rattus tanezumi-R3*. Ce rongeur est inféodé aux milieux anthropiques et semble voyager avec l'homme (cf. partie IV.I). Or le flux de transports humains permettant les migrations de rongeurs entre ce site isolé et les milieux anthropiques extérieurs est très faible. D'autre part, le faible taux de capture suppose que la population est de petite taille.

Il est donc possible que la population ait subi un goulot d'étranglement, c'est-à-dire une réduction du nombre d'individus reproducteurs, qui aurait appauvri la diversité génétique de la population. Un tel phénomène peut être provoqué par un événement contemporain ayant entraîné une forte mortalité dans la population d'origine, comme par exemple un traitement chimique aux AVK. Cependant, le fort taux d'homozygotie observé permet de proposer l'hypothèse d'un effet fondateur, caractérisé par l'introduction récente d'une population de faible effectif à partir d'une seule population souche. Le fort taux d'homozygotie, résulterait alors de la consanguinité de la population souche de petite taille ou de la population immigrée.

Il serait intéressant d'utiliser des analyses complémentaires pour vérifier cette hypothèse, par exemple avec l'étude des allèles rares, ou encore avec l'utilisation de l'indice « M » de Garza, qui permet de reconstruire les histoires d'invasion en discriminant les goulots d'étranglement contemporains ou passés (Garza & Williamson 2001).

### IV.3. RESISTANCE AU COUMATETRALYL

#### IV.3.1. SENSIBILITE AU COUMATETRALYL

La sensibilité aux pesticides varie selon les espèces et les populations (Berrill *et al.* 1994; Bridges & Semilitsch 2000; Endelpols *et al.* 2007). L'identification précise des espèces est donc cruciale pour appréhender les phénomènes de résistances et développer des stratégies de lutte efficaces. D'après nos résultats d'identification moléculaire par la méthode barcoding (Hebert *et al.* 2003), les deux populations expérimentées dans cette étude appartenaient à des espèces différentes. Dans la plantation de Riau, où aucun raticide n'a été utilisé depuis 2002, tous les sujets expérimentaux étaient des rats des champs malais *Rattus tiomanicus*, une espèce arboricole naturellement présente dans la péninsule malaisienne et dans les îles de la Sonde (cf. partie IV.1), qui a progressivement envahit les plantations de palmiers à huile où elle est fréquemment enregistrée (Wood & Fee 2003).

A l'inverse, la composition des espèces était plus complexe dans la plantation de Bangka, qui est intensément traitée aux anticoagulants depuis 1993. Cette population était constituée de deux haplogroupes mitochondriaux correspondant au rat asiatique des maisons *Rattus tanezumi* et au rat oriental des maisons *Rattus R3* (sensu Pagès *et al.* 2003). Ces haplogroupes appartiennent au même clade (Aplin *et al.* 2011) qui a été nommé *Rattus tanezumi-R3* dans l'ensemble de la thèse. Il a précédemment été discuté du statut incertain des espèces étudiées *Rattus tanezumi* et *Rattus R3*. Bien que ces entités diffèrent sur un plan mitochondrial, elles ne sont pas distinguables sur un plan nucléaire (partie IV.2.1.), ce qui suggère des bases génétiques communes et une réponse aux anticoagulants similaire. *Rattus tanezumi-R3* est présent dans de nombreux habitats anthropiques et dans les forêts secondaires, et a probablement été introduit en Indonésie (cf. partie IV.1) (Aplin *et al.* 2011).

L'anticoagulant (AVK) utilisé à Bangka est le coumatétralyl, un anticoagulant de première génération, qui a été préférentiellement choisi parmi les autres molécules pour son faible risque d'intoxication secondaire pour les chouettes effraies, qui sont utilisées pour la lutte biologique (Fisher *et al.* 2003). L'approche conventionnelle pour détecter les phénomènes de

résistance aux anticoagulants est le test BCR (Blood Clotting Response), qui se base sur la mesure d'un temps de coagulation sanguine, le temps de prothrombine (PT), en réponse à l'exposition aux anticoagulants. Les anticoagulants ayant un délai d'action, le temps de coagulation est mesuré plusieurs heures après l'exposition. Ainsi, vingt-quatre heures après l'exposition, le temps de coagulation est significativement augmenté chez un animal sensible aux anticoagulants, alors qu'il est relativement normal chez un animal résistant (Prescott & Buckle 2000).

La plupart des rats expérimentés dans la plantation de Riau, non traitée aux anticoagulants, a été fortement affectée par l'exposition expérimentale aux AVK. Des valeurs élevées de PT ont été obtenues pour environ 80% des animaux testés à la dose efficace de référence ( $ED_{50Rn}$ ) qui a été déterminée chez une lignée de rats bruns *Rattus norvegicus* sensibles aux AVK (Prescott 2003). A cette même dose, environ 20% des rats ont cependant maintenu un faible PT, similaire au temps de coagulation basal enregistré pour cette population (31,5 secondes). Cette variabilité individuelle de réponse aux AVK est courante, même chez les lignées sensibles de rats de laboratoire. Etant donné la forte proportion de réponses positives au coumatétralyl, les résultats obtenus suggèrent que la dose efficace de la population de Riau est similaire à la dose efficace de référence  $ED_{50Rn}$ .

Les faibles réponses enregistrées chez 20% des individus peuvent correspondre à des « faux-positifs » dues à la méthode d'expérimentation (Pelz *et al.* 2005). Néanmoins, elles peuvent aussi caractériser une population mélangée avec des immigrants provenant de villages alentours régulièrement traités, ou encore représenter des individus historiquement sélectionnés par l'utilisation passée des anticoagulants dans la plantation de 1986 à 2002.

Les réponses phénotypiques obtenues pour les rats de la plantation de Bangka, systématiquement traitée au coumatétralyl étaient très différentes de celles de Riau. Dans la plantation de Bangka, des concentrations importantes de coumatétralyl (i.e.  $\geq 4 \times ED_{50Rn}$ ) ont été nécessaires pour induire des valeurs de PT élevées ( $>75$  secondes). Cependant, même à de très fortes doses ( $32 \times ED_{50Rn}$ ), quatre individus sur les cinq testés ont maintenu des valeurs de PT très faibles ( $PT < 56$  secondes).

Les résultats expérimentaux montrent que les rongeurs étaient plus sensibles aux anticoagulants dans la plantation non traitée que dans la plantation traitée. Des phénotypes sensibles ont été observés dans les deux plantations, mais la proportion des phénotypes sensibles était plus importante dans la plantation non traitée. Deux hypothèses peuvent expliquer cette différence entre les rongeurs de la plantation de Riau et les rongeurs de la plantation de Bangka.

La première hypothèse suppose que la sensibilité au coumatétralyl pourrait être une conséquence directe de la pression de sélection effectuée par les traitements systématiques aux AVK. Les phénotypes résistants constitueraient un avantage dans la plantation de Bangka et la proportion de rats résistants augmenterait au détriment des individus sensibles. C'est un phénomène classique de la sélection naturelle et de l'adaptation génétique, qui est observé dans des populations évoluant dans un environnement soumis à des pressions de sélection. Une étude récente a démontré qu'une utilisation systématique et intensive de coumatétralyl pendant une période de six ans, aurait conduit à la sélection de la résistance aux AVK chez le rat noir (Wang *et al.* 2008). Néanmoins, les phénotypes de résistance aux pesticides sont souvent associés à des coûts biologiques (i.e. diminution de la fitness) et sont donc plutôt sélectionnés dans des conditions d'exposition aux pesticides (Coustau *et al.* 2000). Ainsi, le traitement intensif aux AVK dans la plantation de Bangka permettrait le maintien de hauts degrés de résistance phénotypique dans la population de rongeurs. A l'inverse, l'absence de traitement aux AVK depuis de nombreuses années dans la plantation de Riau aurait conduit à la perte de phénotypes résistants dans la population de rongeurs. A ce jour, les coûts à la résistance aux AVK chez les rongeurs n'ont pas été démontrés, bien qu'ils aient été suggérés par certaines études (Hermodson *et al.* 1969; Kohn *et al.* 2008; Partridge 1980).

La deuxième hypothèse suppose que la différence de sensibilité aux AVK observée entre les deux sites pourrait être expliquée par des différences intrinsèques entre les deux espèces *Rattus tiomanicus* et *Rattus tanezumi/R3*. En effet, la sensibilité aux pesticides varie selon les genres (Watanabe *et al.* 2010) et les espèces (Dowding *et al.* 2010; Sroda & Cossu-Leguille 2011; Berrill *et al.* 1994), due aux différentes histoires évolutives ou aux différents

déterminismes génétiques impliqués dans les phénomènes de résistance aux pesticides. Au cours de son histoire évolutive, *Rattus tanezumi/R3* pourrait avoir développé une capacité adaptative pour le mécanisme de résistance au coumatétralyl. Ce clade aurait ainsi acquis des mutations génétiques impliquant différentes conformations structurales et/ou fonctionnelles des protéines impliquées dans les mécanismes de résistances, telle que la cible moléculaire des AVK ou les enzymes de détoxification. *Rattus tanezumi/R3* vit généralement dans des habitats anthropiques qui sont fortement soumis aux pressions de sélection par les AVK et auraient historiquement conduit à une pré-sélection de mécanismes de tolérance aux AVK. Cette évolution adaptative aurait pour conséquence une sensibilité aux AVK plus faible chez *Rattus tanezumi/R3* que chez les autres espèces de rongeurs, tel que *Rattus tiomanicus*. Cette hypothèse repose sur une différence de sensibilité interspécifique entre *Rattus tanezumi/R3* et *Rattus tiomanicus* et suggère que les résultats observés ne dépendent pas de la sélection contemporaine exercée par l'utilisation intensive d'AVK à Bangka durant ces dix dernières années.

Les limites de cette étude expérimentale, dues au faible nombre de sujets expérimentaux et au manque d'informations concernant les niveaux de tolérance aux AVK chez ces espèces, ne permettent pas de choisir entre les deux hypothèses. Cependant, l'hypothèse la plus vraisemblable concerne la sélection contemporaine du phénomène de résistance aux AVK dans la population de *Rattus tanezumi/R3* de Bangka, suite à l'intensité des traitements. Il serait intéressant de capturer et d'étudier des individus sensibles de ce clade dans la zone traitée ainsi que des individus résistants dans la zone non traitée aux AVK. Le croisement de ces deux taxons en laboratoire permettrait d'étudier les mécanismes de résistance dans des lignées aux différents degrés de sensibilité aux AVK. De même, il serait intéressant de mesurer la capacité de résistance aux AVK de *Rattus tiomanicus* en laboratoire.

---

#### IV.3.2. IMPLICATIONS DE VKORC1 DANS LA SENSIBILITE AU COUMATETRALYL

La protéine hépatique VKORC1 est la cible moléculaire des AVK. Les dérivés coumariniques exercent un effet anticoagulant en inhibant la capacité de la protéine VKORC1 de régénérer la vitamine K réduite à partir de vitamine K époxyde (Suttie 1987). Le polymorphisme du gène *vkorc1* est connu pour moduler la réponse aux raticides et influencer ainsi l'efficacité des méthodes de lutte contre les rongeurs (Grandemange *et al.* 2009, Pelz *et al.* 2005). En effet, les mutations SNP peuvent modifier la conformation du site actif de la protéine et ainsi réduire son affinité pour les AVK (Li *et al.* 2010, Rishavy *et al.* 2010). Depuis 2004, le screening du gène *vkorc1* a été utilisé comme un outil de gestion contre les rongeurs pour cartographier les mutations de résistance dans les pays (Pelz *et al.* 2005, Rost *et al.* 2009, Grandemange *et al.* 2010, Baert *et al.* 2012). L'analyse des séquences du gène *vkorc1* dans la population sensible *Rattus tiomanicus* de Riau et dans la population résistante *Rattus tanezumi/R3* de Bangka a permis d'identifier plusieurs mutations silencieuses communes aux deux espèces (R12R, H68H, I107I, T137T) et deux mutations supplémentaires chez *Rattus tanezumi/R3* (L15L et S103S). Les mutations silencieuses ne modifient pas les propriétés enzymatiques de la protéine VKORC1 et ne sont ainsi pas à l'origine de mécanisme de résistance.

Cependant, deux mutations SNP provoquant une substitution d'acide aminé ont été détectées chez *Rattus tanezumi/R3* : I90L et A143V. Le remplacement d'une isoleucine par une leucine à la position 90 n'a pas montré de modification de l'activité de VKORC1 *in vitro* et ne serait ainsi pas responsable de mécanisme de résistance (Rost *et al.* 2009). De plus, cette mutation est également présente chez de nombreuses espèces (e.g. *H. sapiens*, *M. musculus*, *G. gallus*) et serait une substitution d'acide aminé fonctionnellement conservatrice. Par contre, le remplacement d'une alanine par une valine en position 143 augmente l'activité basale de VKORC1 après expression de la protéine recombinante dans les cellules HEK 293 (Rost *et al.* 2009). Cette mutation pourrait être impliquée dans la résistance aux anticoagulants. Elle est associée avec une mutation silencieuse S103S de l'exon 3. Cependant, cet haplotype n'est pas présent chez tous les animaux au phénotype résistant et ne peut ainsi pas être à elle seule

l'origine de la faible sensibilité aux AVK observée chez *Rattus tanezumi/R3* à Bangka. Le phénomène de résistance observé dans cette population n'est donc pas lié à un polymorphisme du gène codant pour la cible des AVK, car aucune mutation identifiée dans *vkorc1* ne permet d'expliquer le phénomène de résistance mesuré dans cette population.

Dans de nombreuses études, les polymorphismes de mutations ponctuelles de *vkorc1* se sont avérés responsables de phénotypes résistant dans des lignées de rongeurs européennes *Rattus norvegicus* (Grandemange *et al.* 2009; Pelz *et al.* 2005). Cependant, d'autres mécanismes doivent être étudiés chez *Rattus tanezumi/R3*. Une mutation fonctionnelle dans le promoteur de *vkorc1* a été associée aux phénomènes de sensibilité à la warfarine chez l'homme (Yuan *et al.* 2005). De plus, la variabilité des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, comme les cytochromes P450 (CYP450), influence fortement les doses efficaces de warfarine (Takeuchi *et al.* 2009). De rares mutations dans les CYP450 peuvent affecter leur fonction enzymatique et la clairance de la warfarine. Il a été mesuré une augmentation de l'hydroxylation de la warfarine par une surexpression des CYP3A2 (cytochrome P450 3A2) chez les rats noirs *Rattus rattus* résistants à la warfarine au Japon (Ishizuka *et al.* 2007). Les deux espèces étudiées dans les plantations de palmier à huile indonésiennes, *Rattus tiomanicus* et *Rattus tanezumi/R3*, sont phylogénétiquement plus proches du rat noir *Rattus rattus* que du rat brun *Rattus norvegicus*, et pourraient avoir ainsi des mécanismes de résistance similaires au rat noir, faisant donc intervenir une modification du métabolisme des AVK.

Cette étude est la première à avoir démontré une tolérance physiologique aux AVK chez les populations de rats invasives des plantations de palmiers à huile en Indonésie. L'identification de marqueurs moléculaires associés à ces phénotypes permettraient le développement d'un biomarqueur. Cet outil permettrait ainsi de prédire l'efficacité des anticoagulants utilisés pour la gestion des rongeurs ravageurs, et ainsi d'adapter les stratégies de lutte pour maintenir une population « sous contrôle ».



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES





## V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Ce présent travail a permis de mettre en évidence la présence de deux espèces prédominantes dans les plantations de palmiers à huile en Indonésie: le rat des champs malais *Rattus tiomanicus* et le rat asiatique des maisons *Rattus tanezumi-R3*. Ce dernier a une distribution abondante. Il aurait été introduit par l'homme, et coloniserait les plantations à partir des villages.

Sa distribution augmente en Malaisie (Wood & Fee 2003 ; Hafidzi & Saayon 2001), où il semble envahir cet agro-écosystème au dépend de l'espèce endémique *Rattus tiomanicus*. Deux hypothèses permettraient d'expliquer ce phénomène. La première propose une compétition interspécifique importante dont *Rattus tanezumi-R3* serait un meilleur compétiteur. La seconde repose sur une hybridation potentielle de ces espèces génétiquement proches, et suggère que *Rattus tanezumi-R3* serait un meilleur reproducteur. D'après les connaissances taxonomiques actuelles (Aplin *et al.* 2011), la première hypothèse est la plus vraisemblable.

- L'élevage de ces espèces en animalerie permettrait de tester leur capacité d'hybridation, et de confirmer ou infirmer la seconde hypothèse précédemment évoquée.

Une troisième hypothèse suggère que ces espèces répondent différemment à la pression de lutte chimique aux AVK, et que cela influence leur patron de distribution géographique. Cela expliquerait l'abondance de *Rattus tanezumi-R3* par rapport à *Rattus tiomanicus* potentiellement plus sensible aux AVK.

- Il serait intéressant de tester l'effet des traitements aux AVK sur l'abondance relative des espèces.

La différenciation génétique entre les espèces *Rattus tiomanicus*, *Rattus tanezumi*, et *Rattus R3* est modérée. La taxonomie de ces espèces est cryptique. Une étude a mis en évidence des croisements peu fertiles entre ces espèces (Dhaliwal 1963).

- La réalisation de croisement entre *Rattus tanezumi* et *Rattus R3* éclairerait leur taxonomie.

Quelle que soit l'espèce ou la caractéristique écologique de la plantation, les populations sont structurées selon un patron d'isolement par la distance. Ces populations sont spatialement continues en palmeraies et semblent peu présentes en milieux naturels. L'organisation en grandes populations continues caractériserait des populations persistantes difficiles à éradiquer (Abdelkrim *et al.* 2005a).

En outre, certaines espèces endémiques provenant des habitats naturels peuvent occuper la plantation, comme par exemple le bandicoot à Irian Jaya. Cela a également été observé dans les plantations de noix de coco en Indonésie (Weist *et al.* 2010). Il est envisageable que la restauration d'habitats naturels au sein des palmeraies pourrait augmenter les interactions biotiques (e.g. compétition, prédation) et constituer une barrière à la dispersion (Veres *et al.* 2011). La gestion durable des plantations de palmiers à huile par l'utilisation du paysage semble constituer une stratégie de lutte intéressante de ces populations de rongeurs (Foster *et al.* 2011, Fitzherbert *et al.* 2008).

- Il serait intéressant de conduire des études en conditions naturelles dans des plantations hétérogènes, pour mesurer la dispersion des rongeurs à travers des patches d'habitats naturels.

Bien que suggéré (Wood & Liao 1978), le phénomène de résistance aux AVK n'avait jamais été démontré chez ces espèces.

La sélection de populations résistantes par les AVK avait déjà été suspectée chez *Rattus losea* en Chine (Wang *et al.* 2008) et chez le campagnol terrestre, *Arvicola terrestris scherman*, en France (Vein *et al.* 2011). Toutefois, il n'est pas exclu que le fort degré de résistance observé

chez cette espèce soit lié à une forte plasticité intrinsèque en réponse à l'exposition aux AVK. Les analyses de génétique des populations couplées aux analyses de résistance aux pesticides suggèrent qu'une utilisation intensive d'AVK provoquerait un effondrement du nombre d'individus sensibles, et que les individus résiduels résistants refonderaient une nouvelle population chez *Rattus tanezumi-R3*. Qu'il soit sélectionné par les AVK ou spontané, le mécanisme de résistance étudié chez *Rattus tanezumi-R3* n'est pas associé à une mutation de la molécule cible VKORC1. Ces résultats incitent fortement à continuer les recherches pour déterminer l'origine de la résistance chez cette espèce. Dans le contexte actuel, déterminer un marqueur génétique de la résistance constitue un outil de gestion intéressant pour attester le statu d'une population (le degré de tolérance aux AVK).

- *Rattus tanezumi-R3* est phylogénétiquement proche du rat noir *Rattus rattus* dont le mécanisme de résistance aux AVK est principalement métabolique (Ishizuka *et al.* 2007). L'étude des enzymes du métabolisme des xénobiotiques tels que les cytochromes P450 permettrait certainement d'identifier l'origine du mécanisme de résistance aux AVK chez *Rattus tanezumi-R3*.
- Vérifier l'existence de populations de *Rattus tiomanicus* résistantes aux AVK, et de populations de *Rattus tanezumi-R3* sensibles aux AVK, permettrait de définir si la résistance aux AVK est spontanée ou sélectionnée dans les palmeraies.

L'hypothèse formulée sur l'éventuelle hybridation des espèces prédominantes dans les palmeraies introduit le problème de transmission de la résistance au sein de ces populations. Un phénomène d'introgression du gène de résistance aux AVK pourrait ainsi être envisagé, comme il a récemment été démontré chez la souris (Song *et al.* 2011).

L'ensemble des résultats obtenus dans ce présent travail de thèse suggère d'adapter les stratégies de gestion anti-rongeur en fonction de l'espèce concernée.

- *Rattus tanezumi-R3* colonise très probablement les plantations par l'intermédiaire de l'homme. En premier lieu, il est donc préconisé de limiter les voies d'introduction de *Rattus tanezumi-R3* dans les plantations, par exemple en isolant les villages et les usines de l'habitat agricole. En second lieu, il est conseillé de limiter l'utilisation de raticide aux anticoagulants AVK à des traitements de contrôles ponctuels et spatialement limité. En effet, *Rattus tanezumi-R3* est capable de développer un fort degré de résistance au coumatétralyl. De plus, il est impossible de définir des unités d'éradication chez cette espèce qui vit en populations spatialement structurées par la distance dans les plantations. Des traitements étendus et systématiques favoriseraient l'établissement de populations fortement résistantes aux anticoagulants AVK, rendant leur contrôle difficile. Enfin, la fragmentation du paysage limite la dispersion de *Rattus tanezumi-R3*. L'utilisation du paysage, tel que l'élaboration de corridors naturels au sein des plantations, semble une technique appropriée pour : limiter l'expansion des populations invasives de *Rattus tanezumi-R3*, limiter la propagation de la résistance, et également favoriser la présence d'espèces endémiques (tels que les prédateurs et les compétiteurs naturels de *Rattus tanezumi-R3*).

- *Rattus tiomanicus* semble coloniser les plantations depuis les habitats naturels. La mise en place de corridors naturels ne permettrait donc pas de limiter son introduction. Cependant, l'utilisation de prédateurs naturels tels que la chouette effraie semble efficace pour contrôler cette espèce de plus petite taille. L'utilisation d'anticoagulants AVK pour contrôler *Rattus tiomanicus* est déconseillée car cette technique favorise l'apparition de la résistance aux AVK dans ces populations spatialement continues, ainsi que l'installation de *Rattus tanezumi-R3*.

Les résultats présentés dans cette thèse incitent fortement à poursuivre les recherches concernant le statut des espèces (e.g. possibilité d'hybridation), la dispersion à travers le paysage (e.g. existence de barrières physiques), et l'origine de la résistance aux AVK (e.g. métabolique). Il est urgent de limiter l'expansion de *Rattus tanezumi-R3* dont la gestion est difficile (résistance aux pesticides). La gestion durable des plantations de palmier à huile dans le Sud-Est asiatique représente un enjeu économique et écologique crucial.

## VI. ANNEXES

### ANNEXE I. LEGENDE DU JEU DE DONNEES GLOBCOVER ET BIOCLIM

Value	Land Cover classes	Value	BioClim variable
1	Tree Cover, broadleaved, evergreen	BIO1	Annual Mean Temperature
2	Tree Cover, broadleaved, deciduous, closed	BIO2	Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))
3	Tree Cover, broadleaved, deciduous, open	BIO3	Isothermality (BIO2/BIO7) (* 100)
4	Tree Cover, needle-leaved, evergreen	BIO4	Temperature Seasonality (standard deviation *100)
5	Tree Cover, needle-leaved, deciduous	BIO5	Max Temperature of Warmest Month
6	Tree Cover, mixed leaf type	BIO6	Min Temperature of Coldest Month
7	Tree Cover, regularly flooded, fresh water	BIO7	Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)
8	Tree Cover, regularly flooded, saline water	BIO8	Mean Temperature of Wettest Quarter
9	Mosaic: Tree Cover / Other natural vegetation	BIO9	Mean Temperature of Driest Quarter
10	Tree Cover, burnt	BIO10	Mean Temperature of Warmest Quarter
11	Shrub Cover, closed-open, evergreen	BIO11	Mean Temperature of Coldest Quarter
12	Shrub Cover, closed-open, deciduous	BIO12	Annual Precipitation
13	Herbaceous Cover, closed-open	BIO13	Precipitation of Wettest Month
14	Sparse herbaceous or sparse shrub cover	BIO14	Precipitation of Driest Month
15	Regularly flooded shrub and/or herbaceous cover	BIO15	Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)
16	Cultivated and managed areas	BIO16	Precipitation of Wettest Quarter
17	Mosaic: Cropland / Tree Cover / Other natural vegetation	BIO17	Precipitation of Driest Quarter
18	Mosaic: Cropland / Shrub and/or grass cover	BIO18	Precipitation of Warmest Quarter
19	Bare Areas	BIO19	Precipitation of Coldest Quarter
20	Water Bodies		
21	Snow and Ice		
22	Artificial surfaces and associated areas		
23	No data		

## ANNEXE II. STATISTIQUES DE BASES DES POPULATIONS DE RIAU, BANGKA, ET IRIAN JAYA

### Riau (n=179)

Loci	Nombre d'allèles	Richesse allélique	Gamme de taille	HWE	Fréquence d'allèles nuls	He	Ho	Fis
D10Rat20	20	13,932	89-129	0	0,11	0,90	0,68	0,24
Rr021	19	12,831	188-224	0	0,06	0,89	0,76	0,14
Rr114	40	21,000	321-377	0	0,06	0,95	0,83	0,13
D18Rat75	16	11,176	100-214	0	0,17	0,87	0,54	0,37
D11Mgh5	21	14,065	221-259	0,027	0,03	0,88	0,84	0,04
Rr068	15	12,159	94-136	0,204	0,01	0,89	0,88	0,01
D11Rat56	12	8,295	264-293	0,014	0,05	0,81	0,70	0,13

### Bangka (n=108)

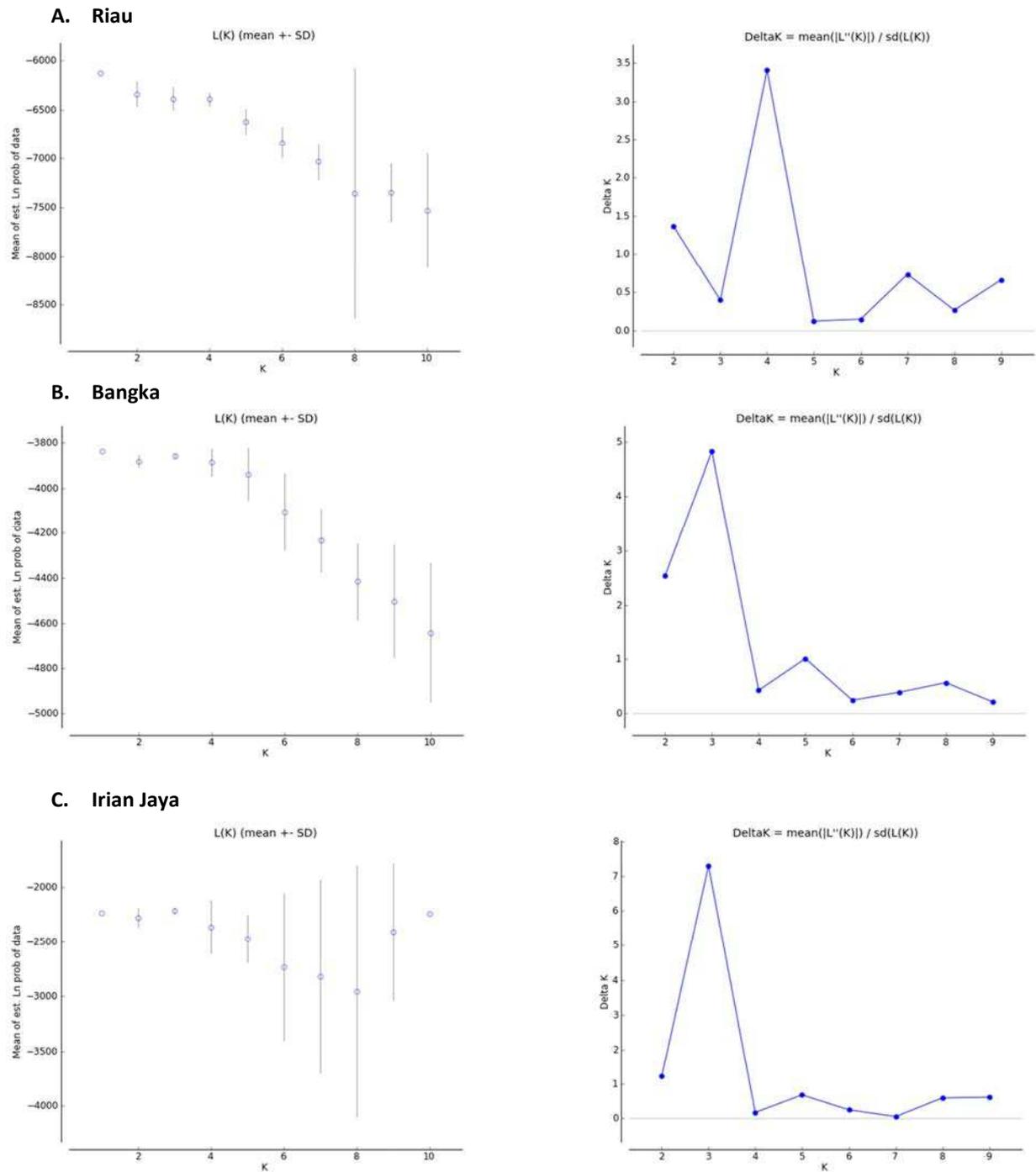
Loci	Nombre d'allèles	Richesse allélique	Gamme de taille	HWE	Fréquence d'allèles nuls	He	Ho	Fis
D10Rat20	21	14,93	87-191	0,22	0,00	0,91	0,96	-0,06
Rr021	19	12,53	182-234	0,32	0,02	0,89	0,87	0,02
Rr114	28	17,64	331-380	0,25	0,00	0,93	0,96	-0,03
D18Rat75	15	11,19	100-196	0,00	0,04	0,87	0,80	0,08
D11Mgh5	22	14,06	226-260	0,00	0,19	0,86	0,50	0,42
Rr068	20	13,88	92-143	0,00	0,07	0,91	0,76	0,17
D11Rat56	17	12,30	271-300	0,00	0,23	0,89	0,46	0,48

### Irian Jaya (n=89)

Loci	Nombre d'allèles	Richesse allélique	Gamme de taille	HWE	Fréquence d'allèles nuls	He	Ho	Fis
D10Rat20	12	8,54	95-161	0,03	0,03	0,80	0,78	0,03
Rr021	14	9,91	182-225	0,23	0,03	0,82	0,78	0,05
Rr114	18	12,30	340-390	0,00	0,07	0,88	0,74	0,16
D18Rat75	8	6,26	176-190	0,84	0,03	0,73	0,69	0,06
D11Mgh5	7	5,54	227-251	0,00	0,09	0,58	0,46	0,20
Rr068	10	7,80	96-142	0,00	0,04	0,81	0,72	0,12
D11Rat56	10	8,09	267-289	0,00	0,10	0,74	0,58	0,21

**Annexe I.** Estimations sur l'ensemble des échantillons. HWE, test exact d'Hardy-Weinberg ; He, hétérozygotie attendue ; Ho, hétérozygotie observée

## ANNEXE III. STRUCTURE GENETIQUE DE RIAU, BANGKA, ET IRIAN JAYA



**Annexe II.** Probabilités postérieures  $[L(K) (\pm SD)]$  obtenues avec le logiciel STRUCTURE (à gauche) et corrigées  $\Delta K$  avec la méthode Evanno (à droite) pour différents nombre de populations théoriques  $K$  [1-10].



## VII. ARTICLE A. PUBLIE DANS ECOTOXICOLOGY 22: 377-386

---

### Coumatetralyl resistance of *Rattus tanezumi* infesting oil palm plantations in Indonesia

J. Andru<sup>1,2,\*</sup>, J.F. Cosson<sup>3</sup>, J.P. Caliman<sup>4</sup>, E. Benoit<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lyon university, VetAgro Sup, UMR 1233 INRA-DGER, Métabolisme des Xénobiotiques et Mycotoxines, F-69280, Marcy l'Etoile, France

<sup>2</sup> Liphatech (De Sangosse group), Research and Development unit, Bonnel, 47480 Pont du Casse, France

<sup>3</sup> INRA, UMR CBGP (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro), Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez cedex, France

<sup>4</sup> SMART Research Institute, P.T. SMART Tbk, Pekanbaru 28112, Riau, Indonesia

\* Corresponding author: Julie Andru

E-mail address: julie andru <andrujulie@gmail.com>

Tel: +33 (0)4 99 62 33 11

Fax: +33 (0)4 99 62 33 45

**KEYWORDS:** *vkorc1*, anticoagulant, *Rattus tanezumi*, *Rattus tiomanicus*, rodent control, South-East Asia

## ABSTRACT

Rodent control is an important issue in human health and agriculture. Oil palm plantations are rapidly expanding in Indonesia and this is having a major economic and ecological impact. Rodent control in oil palm plantations is based principally on the use of anti-vitamin K (AVK), the main anticoagulant used being coumatetralyl, a first-generation AVK.

We conducted a comparative study in two well established oil palm plantations in Indonesia: (1) one without chemical control in Riau and (2) another with intensive coumatetralyl use on Bangka Island. Rat species were identified by the molecular barcoding method. Susceptibility to coumatetralyl was then assessed within the two populations and we screened for mutations in *vkorc1*, which encodes the molecular target of AVK.

Different species were found in the two areas: *Rattus tiomanicus* in Riau, and a mix of *Rattus tanezumi* and a close relative one in Bangka. The rats in Riau were much more susceptible to coumatetralyl than those in Bangka. This study is the first to demonstrate physiological tolerance to AVK in these species. *vkorc1* displayed low levels of polymorphism, and no SNP was associated with the high-tolerance phenotypes of *Rattus tanezumi* clade, even those exposed to very high concentrations (32 x the effective dose of 0.36 mg.kg<sup>-1</sup>). The biochemical basis of this tolerance remains unknown, but may involve the *vkorc1* promoter and/or cytochrome P450 metabolism. We discuss our results and the selective role of anticoagulant use in the occurrence of phenotypic tolerance.

**ABBREVIATIONS:** PT, prothrombin time; AVK, anti-vitamin K; VKOR, vitamin-K epoxide reductase ; VKORC1, vitamin-K epoxide reductase subunit 1; SNP, single nucleotide polymorphism

## INTRODUCTION

Some rat species are well adapted to human environments and are major pests in anthropogenic habitats. In cities and villages, these species constitute a threat to public health, because they carry many zoonotic diseases, including hantaviruses, typhus and leptospirosis (Mills and Childs 1998; Ostfeld and Holt 2004; Plyusnina *et al.* 2009). In agricultural areas, these rodents also spoil and destroy crops. They may cause major damage to many crops, including wheat and corn, and losses may reach 5 to 10% in rice and oil palm crop production in Asia (Singleton *et al.* 2005; Wood and Fee 2003). Panwar and coworkers (2008) considered the role of rats in bamboo crops in the famine in India. Furthermore, the amounts of rice lost to rodents each year could feed 240 million people for a year (Normile 2010; Singleton *et al.* 2003). These reports highlight the serious impact of some rat species on the human environment, leading to their inclusion in the “100 of the World’s worst invasive alien species” list of the IUCN (<http://www.issg.org/>) and illustrating the importance of controlling rodent populations worldwide. Anticoagulants, in the form of coumarin-based rodenticides, are intensively used to control rat populations around the world.

Oil palm, *Elaeis guineensis*, is the most productive of the oleaginous plants. Since the 1970s, the area under oil palm has rapidly expanded in South-East Asia (Carter *et al.* 2007; Corley and Tinker 2003). Almost 8 million hectares are now dedicated to oil palm production in Indonesia, the global leader in oil palm production (Ministry of Agriculture of Indonesia 2009 in Rist *et al.* 2010). The sustainability of the oil palm agroecosystem, including its impact on ecology and the economy in particular, is a major concern in Indonesia.

Rodents are the main mammalian pests in oil palm plantations. Two rat species are commonly found in this agricultural habitat: the Malaysian field rat *Rattus tiomanicus* and the cryptic Asian house rat *Rattus R3* (*sensu* Pagès *et al.* 2010), referred to as *Rattus rattus diardii* by Wood and Fee (2003). *Rattus R3* taxonomy remains unclear, and this clade is considered to be closely related to the oriental house rat *Rattus tanezumi* (Pagès *et al.* 2010). Notwithstanding, analysis of nuclear markers, e.g. microsatellites, cannot differentiate these two entities (data not shown). In this present work, we considered *Rattus R3* and *Rattus tanezumi* mix into a *Rattus tanezumi/R3* clade.

These species are good climbers (Aplin *et al.* 2003) and they feed directly on bunches of oil palm nuts. Another species, the ricefield rat *Rattus argentiventer*, is occasionally found in immature plantations. Rats also feed on the “heart” of immature palms and on weevil grubs, *Elaeidobius kamernucius*, an oil palm pollinator, which develops in male flowers. These rodents are usually controlled by a strategy involving multiple approaches, including chemical and biological (with the barn owl, *Tyto alba*) control. The most widely used biocide is coumatetralyl, a first-generation warfarin derivative with anticoagulant properties that is less damaging than other recent warfarin derivatives for owls (Walker *et al.* 2008). Although it has been reported that coumatetralyl has a relatively long hepatic half-life, 55 days in rats (Fisher *et al.* 2003) and 15.8 days in mice (Vandenbroucke *et al.* 2008), another study reported that coumatetralyl secondary poisoning is at low risk to predatory and scavenging mammal and bird (O’Connor *et al.* 2003). In some cases, rat populations in oil palms have been reported to be potentially resistant to rodenticides. Some observations have suggested that resistance increased after eight years of warfarin use in Malaysia (Wood and Fee 2003). Investigations of the evidence of resistance to anticoagulants in rodents and determination of the underlying mechanisms should help to increase the efficiency of pest management. Most studies of the development of resistance to rodenticides have focused on laboratory strains of rats and mice and on wild populations living among humans: *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* and *Mus musculus*, in cities and farms (Pelz *et al.* 2005; Heiberg 2009). By

contrast, little is currently known about resistance in agricultural systems (but see Huang *et al.* 2011; Vein *et al.* 2011), and only a small number of studies have concerned other rat species, such as *Rattus losea* (Wang *et al.* 2008).

AVK anticoagulants act in the liver, by inhibiting vitamin K epoxide reductase (VKOR) (Oldenburg *et al.* 2007; Wallin and Hutson 2004). This enzyme is involved in the recycling of vitamin K 2,3-epoxide to generate vitamin K hydroquinone, an essential cofactor for blood clotting factor maturation (Wu *et al.* 2011). This interruption of the vitamin K cycle leads to inhibition of the post-translational  $\gamma$ -carboxylation reaction of blood coagulation factors, thereby limiting the chain reaction of the coagulation process. Finally, it causes the death of rodents due to internal or external bleeding after the complete depletion of plasma vitamin K-dependent coagulation factors (about 5 days after ingestion of the bait). Two molecular mechanisms modulating the susceptibility of rats to anticoagulants have been identified: a metabolic mechanism involving cytochromes P450, and a mechanism involving the molecular target of AVK, VKORC1. The role of cytochrome P450s in metabolic detoxification processes is well established. In some resistant rat strains, modification of the expression of hepatic cytochrome P450 leads to increases in both the metabolism and the clearance of anticoagulant (Ishizuka *et al.* 2007). By contrast, mutations in the human Cyp2C9 gene limit the detoxification process, thereby increasing susceptibility to warfarin (Gage *et al.* 2008). Moreover, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *vkorc1* have been shown to modulate strongly the effect of anticoagulant in rats (Grandemange *et al.* 2009; Pelz *et al.* 2005). VKOR was first identified in 1974 (Zimmermann and Matschiner 1974), but the gene encoding the target of anticoagulants, the VKOR subunit 1 (*vkorc1*), was not identified until 2004 (Li *et al.* 2004; Rost *et al.* 2004). Since 2004, the *vkorc1* gene has been used as a new genetic tool for anticoagulant resistance screening in rat populations. In 2005, Pelz and coworkers analyzed the correlation between the various *vkorc1* mutations and phenotypic resistance to anticoagulants in rats. Codons 128 and 139 in exon 3 of the *vkorc1* gene were identified as “hotspots” of resistance mutations. Moreover, a causal link between the Y139F mutation and resistance was subsequently demonstrated, by introducing this SNP into a susceptible strain of Sprague-Dawley rats by the back-cross method (Grandemange *et al.* 2009). This work implicated *vkorc1* polymorphism in the resistance phenotype. *In vitro* experiments showed that some SNPs significantly modulated VKOR enzymatic activity (Rost *et al.* 2009). Several studies have mapped the various SNPs in wild populations of the brown rat *Rattus norvegicus* in Europe and Asia (Grandemange *et al.* 2010; Pelz *et al.* 2005; Rost *et al.* 2009).

We focus here on two populations of rats in Indonesian oil palm plantations. The first population was captured at Bangka, which has been subjected to intensive coumatetralyl applications since 1991, whereas the other population was captured at Riau, where coumatetralyl has not been applied for at least six years. We aimed (1) to identify the species of rats present at the two sites by a molecular barcoding approach (Hebert *et al.* 2003), (2) to study the effect of coumatetralyl in each population of rats, by exposing rats to various amounts of this anticoagulant, and (3) to analyze the *vkorc1* gene sequence with a view to identifying point mutations potentially associated with a decrease in coumatetralyl susceptibility.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **1- Sampling**

All animals were caught by series of one-night trapping sessions using live traps and oil palm nuts as baits. The same technique was used for each capture session: 10 rows of 10 traps (separated by 10 meters) with a distance of 50 meters between each row. The tested animals were kept in individual cages during the 24 hours of experimentation, with food (oil palm nuts) and water *ad libitum*. The rodents selected for the experiments were adult rats caught in March and April 2009 in two well established oil palm plantations in Indonesia (Fig.1). Fifty rats were caught in a plantation in Riau, on Sumatra, which had not been treated with pesticides for at least six years. Seventy-eight rats came from a plantation in Bangka, an island located close to the east coast of Sumatra that has been heavily treated with coumatetralyl, a first-generation warfarin derivative since seven years. Depending on the year, the use of coumatetralyl-based rodenticides in Bangka vary from 1 to 2 kg/ha. The rodenticides used are wax-bound cubes formulated with coumatetralyl (1.125 parts per million). One bait per palm is used when rodent's damages exceed 5% on the crops. Baits are replaced every 3 days until acceptance reaches 20%. The two years before the study, no other pesticides were used in the study sites (e.g. fungicides, insecticides). The sampling site in Bangka was a 16-year-old plantation of 5000 hectares, located in Bangka-BELITUNG province (E: 104°50' - 109°30'; S: 0°50' - 4°10'). The natural habitat at this site is mostly uncommon types of lowland forest, described as a heath forest or padang vegetation, growing on extremely nutrient-poor sandy soil (Whitten *et al.* 2000). The sampling site at Riau is a 23-year-old plantation of 5000 hectares, located in northern part of the island of Sumatra (E: 100°54' - 102°10'; N: 01°16' - 0°20').

## 2- Rat species identification

Rat species were identified using morphology criteria (Aplin *et al.* 2003). To avoid misidentifications, some animals were identified using a DNA barcoding approach based on an analysis of variations in the mitochondrial cytochrome oxidase 1 (CO1) gene (Hebert *et al.* 2003). All rats were rapidly and humanely killed after physiological experiments (see further) and a piece of the tail was collected and stored in 70% ethanol for further genetic analyses. DNA was extracted from tissue samples with the DirectPCR Lysis Reagent (Viagen). A polymerase chain reaction (PCR) was performed with the following primers: BatL5310 (5'-ACTTCTGGGTGTCCAAGAATCA-3') and R6036R (5'-CCTACTCRGCCATTTTACCTATG-3'). Thermal cycling parameters were as follows: 4 min at 94°C, followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 48°C and 1 min at 72°C and then a final extension period of 10 min at 72°C. Amplicons were verified by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and sequencing (Eurofins MWG/Operon). Species were identified with the barcoding tool RodentSEA, recently developed for South-East Asian rodents, which is freely available from [http://www.ceropath.org/barcoding\\_tool/rodentsea](http://www.ceropath.org/barcoding_tool/rodentsea) (Chaval *et al.* 2010). We identify 19 rats from Riau and 36 rats from Bangka to species level by this approach.

## 3- Phenotypic susceptibility to coumatetralyl

The 128 wild rats trapped in the two sampling areas were subjected to physiological experiments to determine their phenotypic coumatetralyl susceptibility in a blood clotting response test (Prescott and Buckle 2000). After trapping animals were kept 24 hours in individual cages and fed with oil palm nuts and water *ad libitum*. Treatments of all animals were performed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Vetagro Sup, Lyon University.

We injected various doses of coumatetralyl into the rats via the intraperitoneal way, which has been shown to be as effective as oral application (Pelz *et al.* 2005). The effective dose (ED<sub>50</sub>) is defined as the AVK concentration required to obtain a positive response in at least 50% of the population exposed to the product. We used as a reference the ED<sub>50RN</sub>, the effective dose for susceptible strains of *Rattus norvegicus* (ED<sub>50</sub>= 0.36 mg.kg<sup>-1</sup> for males and ED<sub>50</sub>= 0.44 mg.kg<sup>-1</sup> for females) (Prescott 2003). The rats were assigned to various experimental groups (n ≥4) treated with different concentrations of coumatetralyl: from 0 x ED<sub>50RN</sub> to 32 x ED<sub>50RN</sub>. Series of dilutions of coumatetralyl (Sigma-Aldrich) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). The control group received physiological saline solution, for determination of the basal blood clotting time of the species. Twenty-four hours after injection, we anesthetized the rats with isoflurane (Forene<sup>®</sup>, Abbot Laboratory, France) and collected blood by intracardiac puncture. A drop of blood was immediately transferred into a citrate-treated IDEXX Coag Dx™ cartridge for the determination of prothrombin time by the Coag Dx™ device. This apparatus measured prothrombin time, saturating at 100 seconds. The blood clotting times recorded after the intraperitoneal injection of various concentrations of coumatetralyl reflect the susceptibility of rats to this anticoagulant. After blood sampling, the death of each animal was rapidly produced by dislocation

#### 4- *vkorc1* amplification and sequencing

We analyzed the *vkorc1* genes of 30 rats — 13 from Riau, Sumatra, and 17 from Bangka — selected on the basis of their phenotypic response to coumatetralyl. The complete *vkorc1* gene (exons 1, 2, 3) was analyzed for 16 individuals (eight from each site), whereas only exon 3 was analyzed in the remaining rats. DNA was extracted from tissue samples with the Macherey-Nagel Nucleospin<sup>®</sup> Tissue kit (Hoerd, France). Polymerase chain reaction (PCR) was carried out as described by Grandemange *et al.* 2010. A 2209 base pair (bp) amplicon was obtained for the complete *vkorc1* gene and a 203 bp amplicon was obtained for exon 3, without the 3' untranslated region (3'UTR). Before sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France), all amplicons were checked by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide, and stored at + 4°C. The sequences obtained were aligned with the consensus *Rattus norvegicus vkorc1* gene sequence (ENSRNOT00000026347) from the Ensembl database (<http://www.ensembl.org>), and mutations were detected with the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) (version 7.0.9.0). The sequences were corrected by manual inspection and complete gene sequences were constructed with Seaview 4.2.12 software (Gouy *et al.* 2010). *vkorc1* haplotypes were deposited in GenBank (JN129977-JN129984). We investigated the effect of single nucleotide polymorphisms, by also comparing the *vkorc1* sequences with those of other species of *Rattus* in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *Rattus losea* from China (EF028346.1) and *Rattus rattus alexandrinus* from Uganda (HM181983.1).

## RESULTS

### 1- Species identification

All wild rats originally from the Riau region were identified as *Rattus tiomanicus*, a species commonly found in oil palm plantations in Asia. The rats captured in the Bangka region were identified as *Rattus tanezumi/R3* clade as defined in the introduction. Analysis of the mitochondrial *CO1* gene confirmed these results for all the rats genotyped (n=19 rats from Riau, n=36 rats from Bangka).

## 2- Phenotypic resistance to coumatetralyl

In Riau, the untreated area, median basal prothrombin time (PT), without coumatetralyl injection, was 31.5 [21-38] seconds, with low response variability between animals (Fig.2a). The intraperitoneal injection of increasing amounts of coumatetralyl increased the median intragroup PT ( $m_{0.5}= 57$ ;  $m_{0.75}= 84.5$ ;  $m_1=92$ ,  $m_2=100$ ). Coumatetralyl also affected intragroup variability. An injection of 1 x  $ED_{50Rn}$  coumatetralyl greatly increased the PT in more than half (15 of 19) of the animals tested, resulting in very high values (>75 seconds). However, four of the 19 rats in this group maintained very low PTs, close to basal levels, and did not seem to be affected by the AVK. Following injections of this concentration of the anticoagulant, about half of the treated animals presented an increased in PT, while after treatment with 2 x  $ED_{50Rn}$  coumatetralyl, the subjects (n=4) had a PT of 100 seconds. Therefore, the  $ED_{50}$  for *Rattus tiomanicus* appeared to be almost identical to the  $ED_{50Rn}$  obtained for *Rattus norvegicus*.

In Bangka, the systematically treated area, the median basal PT recorded was 29 [24-38] seconds (Fig.2b). The median intragroup PT increased with increasing coumatetralyl concentration. However, this increase was less marked than in the Riau population. The injection of 1 x  $ED_{50Rn}$  coumatetralyl had a small effect on group response slightly increasing prothrombin time (median<sub>1</sub> = 40 seconds). Following the administration of doses of more than 4 x  $ED_{50Rn}$ , very high PT values were observed in some individuals, but only a moderate change in median intragroup PT was observed [50-72.5], even after treatment with 32 x  $ED_{50Rn}$ .

### Comparison of the two areas

Basal PT was similar in the *Rattus tiomanicus* population in Riau and the *Rattus tanezumi/R3* clade population in Bangka (nonparametric Wilcoxon test, ns:  $p = 0.62$ ), but the effect of the injection of 1 x  $ED_{50Rn}$  coumatetralyl was significantly different in the two populations (nonparametric Wilcoxon test, \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Overall, the *Rattus tanezumi/R3* clade population was less affected by coumatetralyl than the *Rattus tiomanicus* population.

## 3- *vkorc1* genetic polymorphism

*vkorc1* sequences were aligned with the consensus sequence of an AVK-susceptible strain of *Rattus norvegicus*. We first analyzed exon 3, a hotspot for mutations inducing AVK resistance. Two silent mutations, I107I and T137T, are common to rats from Riau and Bangka. Another two mutations were found to be specific to rats from Bangka: the replacement of alanine-143 by a valine residue in 53% of the rats genotyped in Bangka (44% were homozygous and 56% were heterozygous); and the silent Serine-103-Serine mutation, which seemed to be associated with the A143V mutation (Table 1). A comparison of PT values and mutations revealed no other clear association, as the A143V genotypes, whether homozygous or heterozygous, had PT values that were neither higher nor lower than those for the wild haplotype.

The complete sequence of the *vkorc1* gene obtained from eight rats in the two study areas presented other SNPs in exons 1 and 2 (Table 2). Most were silent, such as R12R, H68H, I107I, T137T. The R12R mutation also occurs in *Rattus rattus alexandrinus* in Africa (Uganda, Diaz *et al.* 2010), but L15L is found only in *Rattus*

*tanezumi/R3* clade in the Bangka region. Nevertheless, we also found an amino-acid substitution, I90L, encoded by exon 2, in all species. This mutation, also present in many other species, such as *Rattus losea*, *Rattus rattus alexandrinus*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*, was studied by Rost and coworkers (2009) and is most probably an ancestral mutation.

Levels of *vkorc1* polymorphism are low in the two species studied, and no SNPs were identified as associated with susceptibility to coumatetralyl.

## DISCUSSION

### Rat species in oil palm plantations

Susceptibility to pesticide varied within and between species (Berrill *et al.* 1994; Bridges and Semilitsch 2000; Endelpols *et al.* 2007). The precise identification of the target pest species, in context, is therefore important for the development of efficient control strategies. Some authors have highlighted the lack of confidence in morphology-based methods and have stressed the relevance of DNA-based barcoding methods for avoiding the misidentification of *Rattus* species in South-East Asia (Robins *et al.* 2007; Pagès *et al.* 2010). It has been pointed out that “Many *Rattus* species are difficult to distinguish morphologically, by both specialists and nonspecialists” (Robins *et al.* 2007) and caution is therefore required when interpreting previously reported data for *Rattus* in South-East Asia. Our molecular barcoding results for the COI gene (Hebert *et al.* 2003) revealed that the rat species found in oil palm plantations were different in the two sites studied.

In the oil palm plantation of Riau, on Sumatra, where no rodenticide has been used since 2002, all the rats collected were identified as Malaysian field rat, *Rattus tiomanicus*. This arboreal species is naturally present in the Malay Peninsula and the surrounding Sunda Shelf islands (including southern Thailand, Borneo, Java and Sumatra), where it originally lived on the edge of the scrub and in secondary forest, but has since moved into oil palm plantations (Buckle *et al.* 1997; Aplin *et al.* 2003). This species has also frequently been recorded in oil palm plantations in Malaysia (Wood and Fee 2003).

By contrast, species composition appears to be more complex in the other sampling area. In the oil palm plantation of Bangka, to the South-East of Sumatra, which has been subject to high chemical pressure for rat control since 1993, we identified two mitochondrial DNA haplogroups: the Asian house rat *Rattus R3* (*sensu* Pagès *et al.* 2010) and the oriental house rat *Rattus tanezumi*. The *Rattus R3* taxon is considered to be a generalist living in close contact with humans, and was probably introduced into various parts of the Indonesian archipelago by human trade activities. *Rattus tanezumi* is found in various anthropogenic habitats, both in towns and crops, and on the edge of secondary forest. Both genetic entities occur in the Sunda Shelf Islands, including both Sumatra and Bangka, and our data indicate that they are sympatric on Bangka. Previous studies have also reported this to be the case: “(...) the island populations of the Sunda Shelf contain a complex admixture of both major haplotype groups (...)” (Wilson and Reeder 2005). Some authors consider *Rattus diardii* (i.e. *Rattus R3*) to be synonymous with *rattus tanezumi* (Musser and Carlton 2005). However, it has been observed that nuclear markers, e.g. microsatellites, cannot differentiate these two groups (data not shown). The sharing of common alleles shows may be due to current gene flow or to ancestral polymorphism. Nonetheless, individuals with similar nuclear genetic material are expected to respond similarly to same environmental context, such as pesticide pressure. In this study, we consider *Rattus tanezumi/R3* clade including both *Rattus R3* and *Rattus tanezumi*.

## Susceptibility to coumatetralyl

The rodenticide used in Bangka is coumatetralyl, a first-generation anticoagulant rodenticide (FGAR), which has been preferred over other molecules because of there is relatively little risk of first and secondary poisoning of the barn owls used for biological control (Fisher *et al.* 2004). The conventional phenotypic approach to resistance detection is the blood clotting response method (BCR), based on the measurement of prothrombin time (PT) in response to anticoagulant exposure. Twenty-four hours after exposure to AVK, PT increases significantly in animals susceptible to this molecule. By contrast, only a slight change in PT is observed in resistant animals (Prescott and Buckle 2000).

Most of the rats in the untreated area, in Riau, were strongly affected by experimental exposure to AVK. Very high PT values were obtained for about 80% of the animals tested with the doses corresponding to the effective dose ( $ED_{50Rn}$ ) determined for susceptible laboratory strains of *Rattus norvegicus* (Prescott 2003). However, about 20% of the rats had low PT values, similar to the basal blood clotting time measured in Riau (31.5 seconds) after exposure to the  $ED_{50Rn}$ . This variability in response to AVK is common, even in susceptible laboratory strains of rats, and we assume that the high proportion of positive responses to the  $ED_{50Rn}$  demonstrate that this dose is also effective in the population tested in Riau. We acknowledge that these results could also be interpreted as indicating that the rat population is actually an admixture of individuals with different degrees of susceptibility to coumatetralyl, due to the immigration of individuals from the regularly treated villages close to the plantations or past use of anticoagulant in the plantation, from 1986 to 2002.

The results obtained for the rats of Bangka island were very different from those for the rats of Riau. In Bangka, high levels of exposure to coumatetralyl (i.e.  $\geq 4 \times ED_{50Rn}$ ) were required to induce high PT values ( $>75$  seconds). However, even at very high exposures ( $32 \times ED_{50Rn}$ ), some rats continued to display very low PT values: four of the five treated rats had a PT value of less than 56 seconds. Thus, rats were much more susceptible to anticoagulant in the untreated plantation than in the treated plantation. Susceptible phenotypes were found in both the treated and untreated plantations, but the proportion of susceptible phenotypes was much higher in the untreated plantation than in the treated plantation. There are two possible reasons for the difference in susceptibility between the rats of the Riau and Bangka plantations.

Firstly, susceptibility to anticoagulant may be directly related to the selective pressure exerted by AVK treatments. Resistant phenotypes would confer an advantage in the AVK-treated area and their relative abundance would thus be expected to increase in these areas, at the expense of susceptible phenotypes. This is a classical expectation of the natural selection and genetic adaptation of populations in a selective environment. A recent study showed that the almost systematic application of high levels of coumatetralyl over a period of six years may have led to the selection of resistance in rats (Wang *et al.* 2008). Nevertheless, pesticide resistance phenotypes are often associated with a fitness cost (a decrease in fitness) and are therefore selected mostly in conditions of pesticide exposure (Coustau *et al.* 2000). Thus, the intensive AVK treatment on Bangka Island probably maintains high levels of phenotypic resistance in the rat population. Conversely, in the Riau plantation, the absence of AVK treatment for a number of years may have resulted in the loss of resistant phenotypes in the rat population. It has not yet clearly been established that AVK resistance in rodents entails a fitness cost, although some reports have suggested that this is the case (Hermodson *et al.* 1969; Kohn *et al.* 2008; Partridge 1980).

Alternatively, there may be intrinsic differences in susceptibility between the species, *Rattus tiomanicus* and *Rattus tanezumi/R3* clade. Pesticide susceptibility has been shown to vary between genera (Watanabe *et al.* 2010) and species (Dowding *et al.* 2010; Sroda and Cossu-Leguille 2011; Berrill *et al.* 1994), due to differences in evolutionary history or differences in genetic architecture with respect to pesticide resistance. During its evolutionary history, *Rattus tanezumi/R3* clade may have developed a capacity for adaptive resistance to coumatetralyl. *Rattus tanezumi/R3* clade may have acquired mutations resulting in different structural and/or functional conformations and activities of the proteins involved in the resistance mechanism, such as the molecular target of AVK or detoxification enzymes. This species generally lives in anthropogenic habitats

systematically subject to AVK selection pressure, and this may have led to a historical preselection of AVK tolerance. This specific pattern of evolution in *Rattus tanezumi/R3* clade may have resulted in a lower susceptibility than in other *Rattus* species, such as *Rattus tiomanicus* in particular. This hypothesis supports the notion that *Rattus tanezumi/R3* clade was simply originally less susceptible to coumatetralyl than *Rattus tiomanicus* and that this difference in susceptibility is not a direct consequence of the selection pressure induced by anticoagulant treatment on Bangka over the last 10 years.

Given the limitations of our approach — the small number of individuals studied and the absence of previous information on AVK tolerance status — we cannot formally distinguish between these two hypotheses. However, the most parsimonious hypothesis would be the selection of resistance mechanisms in the population of *Rattus tanezumi/R3* clade on Bangka. It would be interesting to obtain and to study susceptible *Rattus tanezumi/R3* clade in the treated area or resistant *Rattus tanezumi/R3* clade in the untreated area. The crossing of these two taxa in the laboratory would make it possible to investigate resistance mechanism in susceptible and less susceptible strains, as a reference. In addition, population genetics studies would provide information about the patterns of colonization of oil palm plantations by the various species as a function of AVK exposure (see Belfiore and Anderson 2001).

#### **Involvement of *vkorc1* in susceptibility to coumatetralyl**

VKORC1 is the hepatic molecular target of AVK. Coumarin derivatives exert their anticoagulant effects by preventing the ability of VKORC1 protein to regenerate reduced vitamin K from its epoxide form (Suttie 1987). *Vkorc1* genetic polymorphism has been shown to mediate the response to rodenticide and to modulate the efficacy of rodent population control (Grandemange *et al.* 2009, Pelz *et al.* 2005). SNPs can modulate the active site of the protein, reducing its affinity for AVK (Li *et al.* 2010, Rishavy *et al.* 2010). Since 2004, the *vkorc1* gene has been used as a genetic screening tool for countrywide investigations of resistance (Pelz *et al.* 2005, Rost *et al.* 2009, Grandemange *et al.* 2010). We analyzed the *vkorc1* sequences of both susceptible and less susceptible rats of the *Rattus tanezumi/R3* clade in Bangka and of *Rattus tiomanicus* in Riau. We identified several silent mutations in both species (R12R, H68H, I107I, T137T) and two silent mutations present solely in *Rattus tanezumi/R3* clade (L15L and S103S). Silent mutations do not affect the properties of the VKORC1 protein and therefore cannot be responsible for resistance. However, two amino-acid substitutions were also found in *Rattus tanezumi/R3* clade: I90L and A143V. The replacement of isoleucine-90 by a leucine residue has no effect on VKOR activity *in vitro*, and is found in many species in individuals with a wild-type phenotype (*E. G. H. SAPIENS, M. MUSCULUS, G. GALLUS*). *THIS MUTATION COULD BE* related to a functionally conservative amino-acid substitution (Rost *et al.* 2009). However, the replacement of alanine-143 by a valine residue might be involved in anticoagulant resistance (Rost *et al.* 2009), increasing the basal activity of VKORC1 protein after recombinant expression in HEK 293 cells. This genotype is linked to the silent mutation S103S in exon 3. However, this haplotype is not present in all the resistant animals of Bangka, and cannot account for the low susceptibility observed in *Rattus tanezumi/R3* clade. We identified no SNPs in *vkorc1* associated with the phenotypic resistance observed. Thus, the phenomenon observed in Bangka does not result from polymorphism of the gene encoding the molecular target of AVK.

In many studies, *vkorc1* single nucleotide polymorphisms have been shown to be responsible for resistant phenotypes in European strains of *Rattus norvegicus* (Grandemange *et al.* 2009; Pelz *et al.* 2005). However, other possible explanations for *Rattus tanezumi/R3* clade phenotypes remain to be explored. A new functional mutation in the *vkorc1* promoter in humans has recently been associated with warfarin susceptibility (Yuan *et al.* 2005). Variation of the genes encoding enzymes involved in drug metabolism, such as cytochrome P450 (CYP450), greatly influences effective warfarin doses (Takeuchi *et al.* 2009). Rare missense mutations in cytochrome P450 may affect enzyme function and warfarin clearance. Moreover, a higher CYP3A2 (cytochrome

P450 3A2) expression in warfarin resistant rats increases the hydroxylation of warfarin in *Rattus rattus* in Japan (Ishizuka *et al.* 2007). The two species studied — *Rattus tiomanicus* and *Rattus tanezumi/R3* clade — are phylogenetically closer to *R. rattus* than *R. norvegicus*, and may therefore have developed the same resistance mechanism to AVK.

This study is the first to demonstrate physiological tolerance to AVK in *Rattus* in oil palm plantations. Identify molecular markers associated with this phenotype could be used as a biomarker for predicting effective anticoagulant use for the control of pest rodent populations to ensure the maintenance of “non-pest” status for the populations concerned.

## Conclusion

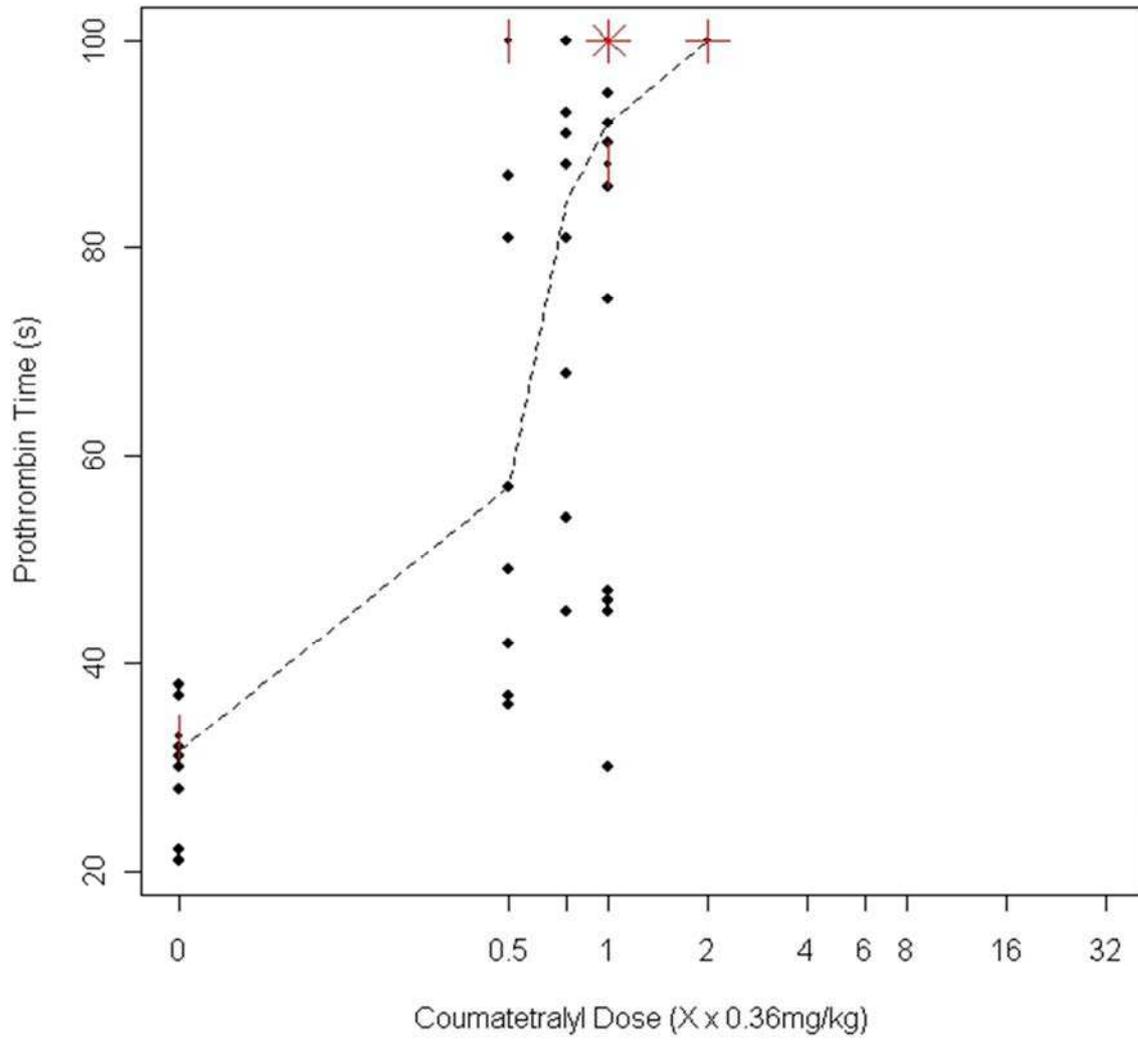
We demonstrated strong resistance to chronic AVK exposure in *Rattus tanezumi/R3* clade, a close relative of black rat, in oil palm habitats. The low level of coumatetralyl susceptibility measured in *Rattus tanezumi/R3* clade in Bangka may result from the selection of resistance under intensive exposure to this xenobiotic, or intrinsically high levels of plasticity in response to AVK exposure. The first of these hypotheses is the most likely. According to this hypothesis, the systematic use of AVK may select individuals genetically resistant to the xenobiotic, leading to the establishment of a resistant population, as suspected for *Rattus losea* in China (Wang *et al.* 2008) and water voles, *Arvicola terrestris scherman*, in France (Vein *et al.* 2011). The mechanism underlying this resistance, whether selected by AVKs or spontaneous, cannot be explained by a change in the sequence of the target protein, VKORC1. Other resistance mechanisms, such as metabolic resistance in particular, remain to be studied. Further investigations might identify SNPs involved in this resistance process, in the gene encoding cytochrome P450 for example, thus providing tools for the integrated management of rat populations based on tolerance status.

Figures

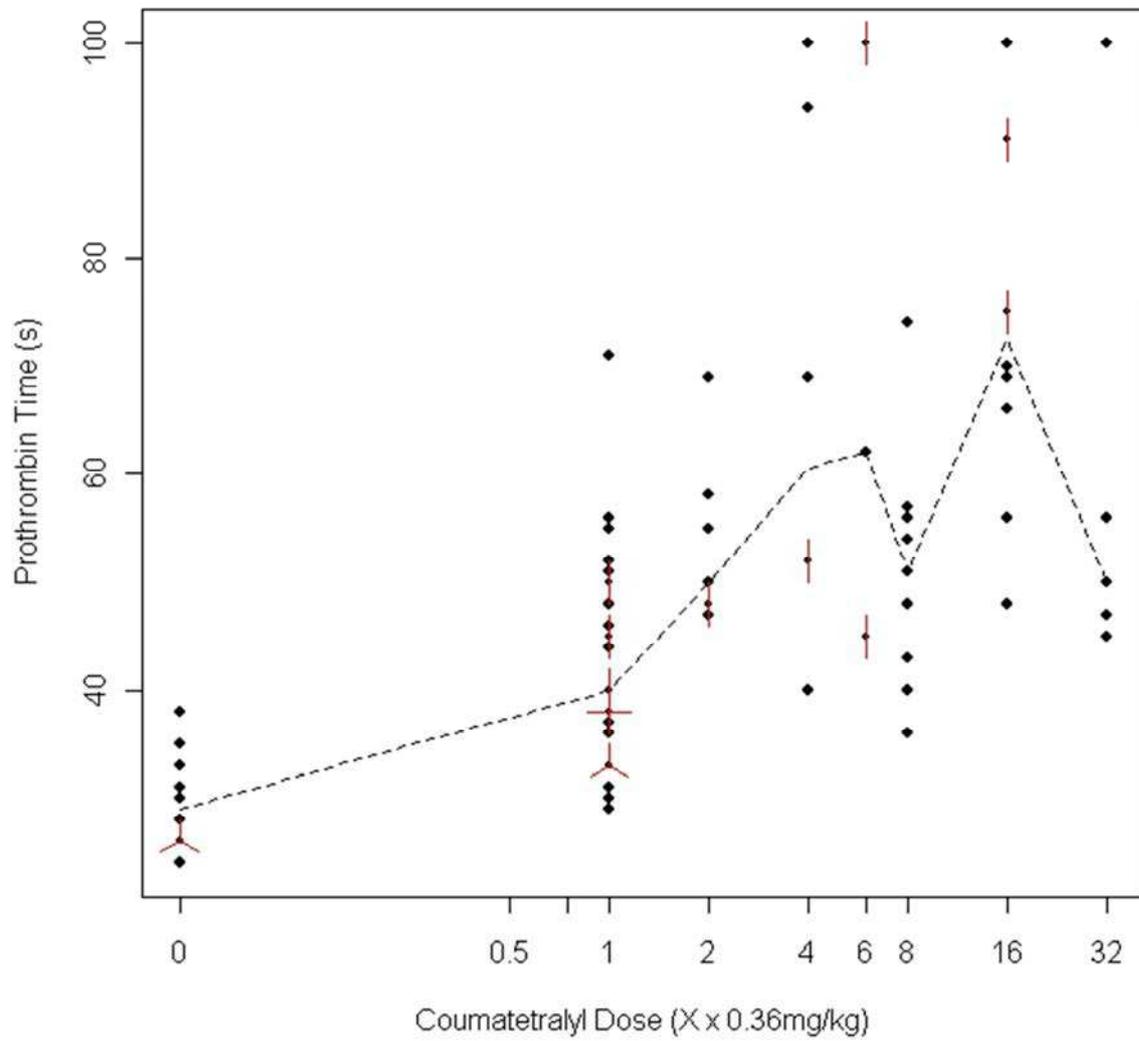


**Fig. 1** Geographic locations of the sites at which the two wild rat populations were sampled, Riau and Bangka, in Indonesia.

a



b



**Fig. 2** Prothrombin time measured 24 h after the intraperitoneal injection of a coumatetralyl dose in adult rats (groups of  $n \geq 4$ ).

● represents the response recorded for each animal, and the lines link the medians. Multiple points are plotted as 'sunflowers' in R software, with each 'petal' representing one of the points superimposed. A logarithmic scale is used on the x-axis, to facilitate comparison of the *Rattus tiomanicus* population in the untreated area (a) and the *Rattus tanezumi/R3* clade population in the area highly exposed to anticoagulant (b). The basal PT was similar at both sites (no significant difference, Wilcoxon  $P=0.62$ ). PT increased with increasing coumatetralyl concentration, as did the variability, of each group in (a) and (b). Exposure to 1 x 0.36 mg.kg<sup>-1</sup> AVK had a significantly different effect in the two areas (Wilcoxon \*\*\*  $P<0.001$ ). The median PT recorded in (a) increased rapidly with AVK concentration, whereas that recorded in (b) remained low, even at a dose of 32 x 0.36 mg.kg<sup>-1</sup> coumatetralyl.

Concentration of coumatetralyl injected (X x 0.36mg/kg)	Prothrombin time (seconds)	Coumatetralyl susceptibility phenotype	Amino acid substitutions	Silent mutations
a				
0.75	93	+	-	-
0.75	45	-	-	-
1	100	+	-	-
1	100	+	-	-
1	100	+	-	-
1	100	+	-	-
1	100	+	-	-
1	92	+	-	-
1	75	+	-	-
1	46	-	-	-
1	45	-	-	-
1	30	-	-	-
2	100	+	-	-
b				

1	55	-	A143V*	S103S*
1	38	-	A143V	S103S
1	38	-	-	-
<hr/>				
4	100	+	-	-
<hr/>				
6	100	+	A143V	S103S
6	100	+	-	-
6	45	-	A143V*	S103S*
<hr/>				
8	48	-	-	-
8	36	-	A143V	S103S
<hr/>				
16	91	+	A143V*	-
16	56	-	-	-
16	48	-	-	-
<hr/>				
32	100	+	-	-
32	56	-	-	-
32	50	-	A143V*	S103S
32	47	-	A143V*	S103S*
32	45	-	A143V	S103S

**Table 1** Dose-response data for coumatetralyl and *vkorc1* exon 3 mutations in *Rattus tiomanicus* (n=13) from Riau (a) and *Rattus tanezumi/R3* clade (n=17) from Bangka (b).

+ Animals susceptible to the dose injected (i.e. high PT>75 s)

- Animals resistant to the dose injected (i.e. low PT<75 s)

\* Animals heterozygous for mutations

	<i>Rattus tiomanicus</i>	<i>Rattus tanezumi</i> /R3 clade	<i>Rattus losea</i> (Wang 2008)	<i>Rattus rattus alexandrinus</i> (Diaz 2010)
Exon 1 <i>vkorc1</i>	R12R	R12R L15L		R12R
Exon 2 <i>vkorc1</i>	<b>I90L</b> H68H	<b>I90L</b> H68H	<b>I90L</b>	<b>I90L</b>
Exon 3 <i>vkorc1</i>	I107I T137T	S103S (53%) I107I T137T <b>A143V (53%)</b>		

**Table 2** *vkorc1* SNPs in *Rattus tiomanicus*, *Rattus tanezumi*/R3 clade and other *Rattus* species. Comparison with the consensus sequence of *Rattus norvegicus* (ENSRNOT00000026347). Amino-acid substitutions are shown in bold; the other mutations are silent (not shown in bold).

## Acknowledgments

We would like to thank all the staff in Indonesia for assistance with field work. We thank D. Bourguet, G. Dobigny, and J-F Martin for scientific assistance and Y. Chaval for technical assistance. We thank M.L. Delignette-Muller for statistical advice. This work was supported by the French *Association Nationale Recherche Technologie* (ANRT) and two companies: Liphatech and PT-SMART.

## References

- Aplin KP, Brown PR, Jacob J, Krebs CJ, Singleton GR (2003) Field methods for rodent studies in Asia and the Indo-Pacific. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra
- Belfiore NM, Anderson SL (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat Res* 489:97-122
- Berrill M, Bertram S, McGilliray L, Kolohon M, Pauli B (1994) Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environ Toxicol Chem* 13:657-664
- Bridges CM, Semlitsch RD (2000) Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. *Conserv Biol* 14:1490-1499
- Buckle AP, Chia TH, Fenn MGP, Visvalingam M (1997) Ranging behaviour and habitat utilisation of the Malayan wood rat (*Rattus tiomanicus*) in an oil palm plantation in Johore, Malaysia. *Crop Protect* 16:467-473
- Carter C, Finley W, Fry J, Jackson D, Willis L (2007) Palm oil markets and future supply. *Eur J Lipid Sci Technol* 109:307-314
- Chaval Y, Clairon N, Lepicard D, Dumas D, Chavernac D, Dehne GA, Piry S, Dorkeld F [Online, Web service]. RodentSEA: an online web service for rodent species identification in South-East Asia. <http://www.ceropath.org/rdbsea/pipeline> (in line on 15th October 2010).
- Corley RHW, Tinker PB (2003) The origin and development of the oil palm industry. In: *The Oil Palm*, 4<sup>th</sup> edn. Wiley-Blackwell, pp 1-26
- Coustau C, Chevillon C, Ffrench-Constant R (2000) Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends Ecol Evol* 15:378-383
- Diaz JC, Song Y, Moore A, Borchert JN, Kohn M (2010) Analysis of *vkorc1* polymorphisms in Norway rats using the roof rat as outgroup. *BMC Genet* 11:43
- Dowding CV, Shore RF, Worgan A, Baker PJ, Harris S (2010) Accumulation of anticoagulant rodenticides in a non-target insectivore, the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Environ Pollut* 158:161-166
- Endepols S, Prescott CV, Klemann N, Buckle AP (2007) Susceptibility to the anticoagulants bromadiolone and coumatetralyl in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the UK and Germany. *Int J Pest Manag* 53:285-290

- Fisher P, O'Connor C, Wright G, Eason CT (2003) Persistence of four anticoagulant rodenticides in the livers of laboratory rats. DOC Sci Intern Ser 139, Wellington
- Fisher POC C, Wright G, Eason CT (2004) Anticoagulant residues in rats and secondary non-target risk. DOC Sci Intern Ser 188, Wellington
- Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, Milligan PE, Grice G, Lenzini P, Rettie AE, Aquilante CL, Grosso L, Marsh S, Langae T, Farnett LE, Voora D, Veenstra DL, Glynn RJ, Barrett A, McLeod HL (2008) Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. Clin Pharmacol Ther 84:326-331
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 27:221-224
- Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Berny P, Benoit E (2009) Consequences of the Y139F *Vkorc1* mutation on resistance to AVKs: *in-vivo* investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. Pharmacogenet Genomics 19:742-750
- Grandemange A, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Benoit E, Berny P (2010) Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. Pest Manag Sci 66:270-276
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 41:95-98
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond Ser B 270:313-321
- Heiberg AC (2009) Anticoagulant resistance: a relevant issue in sewer rat (*Rattus norvegicus*) control? Pest Manag Sci 65:444-449
- Hermodson MA, Suttie JW, Link KP (1969) Warfarin metabolism and vitamin K requirement in the warfarin resistant rat. Am J Physiol 217:1316-1319
- Huang BH, Feng ZY, Yue LF, Yao DD, Gao ZX, Wang DW, Liu XH (2011) Warfarin resistance test and polymorphism screening in the *VKORC1* gene in *Rattus flavipectus*. J. Pest Sci. 84:87-92
- Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, Fujita S (2007) Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. Drug Metab Dispos 35:62-66
- Kohn MH, Price RE, Pelz HJ (2008) A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant *Vkorc1* mutant rats. Artery Res 2:138-147
- Li T, Chang C-Y, Jin D-Y, Lin P-J, Khvorova A, Stafford DW (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. Nat 427:541-544
- Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, Rapoport TA (2010) Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. Nat 463:507-512

- Mills JN, Childs JE (1998) Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg Infect Dis* 4:529-537
- Musser G, Carleton M (2005) Superfamily Muroidea. In: Wilson DE, Reeder DM (ed) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore pp 894-1531
- Normile D (2010) Holding back a torrent of rats. *Sci* 327:806-807
- O'Connor CE, Eason CT, Endepols S (2003) Evaluation of secondary poisoning hazards to ferrets and weka from the rodenticide coumatetralyl. *Wildl Res* 30:143-146
- Oldenburg J, Watzka M, Rost S, Muller CR (2007) VKORC1: molecular target of coumarins. *J Thromb Haemost* 5:1-6
- Ostfeld RS, Holt RD (2004) Are predators good for your health? Evaluating evidence for top-down regulation of zoonotic disease reservoirs. *Front Ecol Environ* 2:13-20
- Pages M, Chaval Y, Herbreteau V, Waengsothorn S, Cosson JF, Hugot JP, Morand S, Michaux J (2010) Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. *BMC Evolut Biol* 10:184
- Panwar P (2008) Bamboo and famine. *Curr Sci* 94:1547
- Partridge GG (1980) The vitamin-K requirements of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) resistant to warfarin. *Comp Biochem Physiol* 66: 3-7
- Pelz H-J, Rost S, Huenerberg M, Fregin A, Heiberg AC, Baert K, MacNicol AD, Prescott CV, Walker AS, Oldenburg J, Mueller CR (2005) The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genet* 170:1839-1847
- Plyusnina A, Ibrahim IN, Plyusnin A (2009) A newly recognized hantavirus in the Asian house rat (*Rattus tanezumi*) in Indonesia. *J Gen Virol* 90:205-209
- Prescott CV (2003) A reappraisal of blood clotting response tests for anticoagulant resistance and a proposal for a standardised BCR test methodology. RRAC, Tech monogr 2003, Croplife Int, Brussel.  
[http://www.rrac.info/downloads/technical\\_monograph\\_2003\\_BCR.pdf](http://www.rrac.info/downloads/technical_monograph_2003_BCR.pdf)
- Prescott CV, Buckle AP (2000) Blood-clotting response tests for resistance to diphacinone and chlorphacinone in the Norway Rat (*Rattus norvegicus* Berk.). *Crop Prot* 19:291-296
- Rishavy MA, Usubalieva A, Hallgren KW, Berkner KL (2010) Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *J Biol Chem* 286:7267-7278
- Rist L, Feintrenie L, Levang P (2010) The livelihood impacts of oil palm: smallholders in Indonesia. *Biodivers Conserv* 19:1009-1024
- Robins JH, Hingston M, Matisoo-Smith E, Ross HA (2007) Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Mol Ecol Notes* 7:717-729

- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EGD, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nat* 427:537-541
- Rost S, Pelz HJ, Menzel S, MacNicoll A, Leon V, Song KJ, Jakel T, Oldenburg J, Muller CR (2009) Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice - a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet* 10:4
- Singleton GR, Sudarmaji, Jacob J, Krebs CJ (2005) Integrated management to reduce rodent damage to lowland rice crops in Indonesia. *Agric Ecosyst Environ* 107:75-82
- Singleton GR, Hinds LA, Krebs CJ, Spratt DM (2003) Rats, mice and people: rodent biology and management. Aust Cent Int Agric Res, Canberra. <http://www.aciar.gov.au/publication/MN096>
- Sroda S, Cossu-Leguille C (2011) Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? *Ecotoxicol* 20:264-273
- Suttie JW (1987) The biochemical basis of warfarin therapy. *Adv Exp Med Biol* 214:3-16
- Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, Whittaker P, Ranganath V, Kumanduri V, McLaren W, Holm L, Lindh J, Rane A, Wadelius M, Deloukas P (2009) A genome-wide association study confirms *VKORC1*, *CYP2C9*, and *CYP4F2* as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet* 5:e1000433
- Vandenbroucke V, Bousquet-Melou A, De Backer P, Croubels S (2008) Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J Vet Pharmacol Ther* 31:437-445
- Vein J, Grandemange A, Cosson JF, Benoit E, Berny P (2011) Are water vole resistant to anticoagulant rodenticides following field treatments? *Ecotoxicol* 20:1432-1441
- Walker LA, Turk A, Long SM, Wienburg CL, Best J, Shore RF (2008) Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Sci Total Environ* 392:93-98
- Wallin R, Hutson SM (2004) Warfarin and the vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation system. *Trends Mol Med* 10:299-302
- Wang J, Feng Z, Yao D, Sui J, Zhong W, Li M, Dai J (2008) Warfarin resistance in *Rattus losea* in Guangdong Province, China. *Pestic Biochem Physiol* 91:90-95
- Watanabe KP, Saengtienchai A, Tanaka KD, Ikenaka Y, Ishizuka M (2010) Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 152:114-119
- Whitten T, Damanik SJ, Anwar J, Hisyam N (2000) Uncommon lowland forests. In: Periplus (ed) *The ecology of Sumatra*. pp 253-276
- Wilson DE, Reeder DM (2005) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Wood BJ, Fee CG (2003) A critical review of the development of rat control in Malaysian agriculture since the 1960s. *Crop Prot* 22:445-461

Wu S, Liu S, Davis CH, Stafford DW, Kulman JD, Pedersen LG (2011) A hetero-dimer model for concerted action of vitamin K carboxylase and vitamin K reductase in vitamin K cycle. *J Theor Biol* 279:143-149

Yuan HY, Chen JJ, Lee MTM, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, Lu MJ, Hung CR, Wei CY, Chen CH, Wu JY, Chen YT (2005) A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 14:1745-1751

Zimmermann A, Matschiner JT (1974) Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. *Biochem. Pharmacol* 23: 1033-1040

## VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- ABDELKRIM J, PASCAL M, CALMET C, SAMADI S (2005a) The importance of assessing population genetic structure prior to eradication of invasive species: examples from insular *Rattus norvegicus* populations. *Conserv Biol* 19:1509–1518
- ABDELKRIM J, PASCAL M, SAMADI S (2005b) Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Mol Ecol* 14: 2923-2931
- ANDERSSON DI (2006) The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* 9 : 461–465
- APLIN KP, SUZUKI H, CHINEN AA, CHESSER RT, TEN HAVE JT *et al.* (2011) Multiple Geographic Origins of Commensalism and Complex Dispersal History of Black Rats. *PLoS ONE* 6: e26357
- APLIN KP, BROWN PR, JACOB J, KREBS CJ, SINGLETON GR (2003) Field methods for rodent studies in Asia and the Indo-Pacific. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra
- BAERT K, STUYCK J, BREYNE P, MAES D, CASAER J (2012) Distribution of anticoagulant resistance in the brown rat in Belgium. *Belg J Zool* 142 : 39-48
- BASTOS AD, NAIR D, PETER J TAYLOR PJ, BRETTSCHEIDER H, KIRSTEN F *et al.* (2011) Genetic monitoring detects an overlooked cryptic species and reveals the diversity and distribution of three invasive *Rattus* congeners in south Africa. *BMC Genet* 12:26
- BELFIORE NM, ANDERSON SL (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat Res* 489:97-122
- BERRILL M, BERTRAM S, MCGILLIRAY L, KOLOHON M, PAULI B (1994) Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environ Toxicol Chem* 13:657-664
- BELKHIR K, BORSA P, CHIKHI L, RAUFASTE N, BONHOMME F (2000) GENETIX 4.0, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier France
- BELL RG (1978) Metabolism of vitamin K and prothrombin synthesis: anticoagulants and the vitamin K--epoxide cycle. *Fed Proc* 37: 2599-2604
- BERKNER KL (2005) The vitamin K–dependent carboxylase. *Annu Rev Nutr* 25: 127-149
- BRIDGES CM, SEMLITSCH RD (2000) Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. *Conserv Biol* 14:1490-1499
- BRUNTON CFA, MACDONALD DW, BUCKLE AP (1993) Behavioural resistance towards poison baits in brown rats, *Rattus norvegicus*. *Appl Anim Behav Sci* 38 : 159-174

- BOYLE CM (1960) Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nat* 188: 517
- BUCKLE AP, CHIA TH, FENN MGP, VISVALINGAM M (1997) Ranging behaviour and habitat utilisation of the Malayan wood rat (*Rattus tiomanicus*) in an oil palm plantation in Johore, Malaysia. *Crop Protect* 16:467-473
- BUCKLEY LB, URBAN MC, ANGILLETTA MJ, CROZIER LG, RISSLER LJ, SEARS MW (2010) Can mechanism inform species' distribution models? *Ecol Lett* 13:1041-54
- CAIN D, HUTSON SM, WALLIN R (1997) Assembly of the Warfarin-sensitive Vitamin K 2,3-Epoxide Reductase Enzyme Complex in the Endoplasmic Reticulum Membrane. *J Biol Chem* 272 : 29068-29075
- CARLSON J (2008) Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *J Hered* 99 : 616-623
- CARTER C, FINLEY W, FRY J, JACKSON D, WILLIS L (2007) Palm oil markets and future supply. *Eur J Lipid Sci Technol* 109:307-314
- CHAMBERS JL, GARANT D (2010) Determinants of Population Genetic Structure in Eastern Chipmunks (*Tamias striatus*): The Role of Landscape Barriers and Sex-Biased Dispersal. *J Hered* 101 : 413-422
- CHAMBERS LK, LAWSON MA, HINDS LA (1999) Biological control of rodents - the case for fertility control using immunocontraception. In: *Ecologically-Based Management of Rodent Pests* (Ed: SINGLETON GR, HINDS LA, LEIRS H, ZHANG Z) Aust Cent Int Agric Res, Canberra
- CHAPUIS MP, ESTOUP A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular. Biol Evol* 24 : 621-631
- CHAVAL Y, CLAIRON N, LEPICARD D, DUMAS D, CHAVERNAC D, *et al.* [Online, Web service]. RodentSEA: an online web service for rodent species identification in South-East Asia. <http://www.ceropath.org/rdbsea/pipeline> (in line on 15th October 2010).
- CHU PH, HUANG TY, WILLIAMS J, STAFFORD DW (2006) Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci* 103: 19308-19313
- COLAUTTI RI, MACISAAC HJ (2004) A neutral terminology to define 'invasive' species. *Divers Distrib* 10 : 135-141
- CORLEY RHW, TINKER PB (2003) The origin and development of the oil palm industry. In: *The Oil Palm*, 4<sup>th</sup> edn. Wiley-Blackwell, pp 1-26
- CORNUET J-M, PIRY S, LUIKART G, ESTOUP A, SOLIGNAC M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origin of individuals. *Genet* 153:1989-2000.
- COUSTAU C, CHEVILLON C, FFRENCH-CONSTANT R (2000) Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends Ecol Evol* 15:378-383

- CZOGALLA KJ, WATZKA M, WESTHOFEN P, MARINOVA M, MULLER J, OLDENBURG J (2009) Quantitative analysis of mRNA expression of genes involved in the vitamin K-cycle in mouse-tissue. Communication
- D'ANDREA G, D'AMBROSIO RL, DI PERNA P, CHETTA M, SANTACROCE R *et al.* (2005) A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 105: 645–649
- DALY AK, AITHAL GP (2003) Genetic regulation of warfarin metabolism and response. *Semin Vasc Med* 3: 231-8
- DAVIDSON AM, JENNIONS M, NICOTRA AB (2011) Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. *Ecol Lett* 14: 419–431
- DHALIWAL SS (1963) Breeding experiments and pelage differences between two subspecies of *Rattus rattus* (*diardii* and *jalorensis*) in Malaya. *Bull Nat Mus* 32:31-44
- DIAZ JC, SONG Y, MOORE A, BORCHERT JN, KOHN M (2010) Analysis of *vkorc1* polymorphisms in Norway rats using the roof rat as outgroup. *BMC Genet* 11:43
- DOWD P, HERSHLINE R, HAM SW, NAGANATHAN S (1995) Vitamin K and energy transduction: a base strength amplification mechanism. *Sci* 269: 1684–91
- DOWDING CV, SHORE RF, WORGAN A, BAKER PJ, HARRIS S (2010) Accumulation of anticoagulant rodenticides in a non-target insectivore, the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Environ Pollut* 158:161-166
- DUCKETT JE (1976) Owls as major predators of rats in oil palm estates with particular reference to the barn owl (*Tyto alba*). *Planter Kuala Lumpur* 52 : 4–15
- EARL, DENT A AND VONHOLDT, BRIDGETT M (2011) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* pp 1-3
- ENDEPOLS S, PRESCOTT CV, KLEMANN N, BUCKLE AP (2007) Susceptibility to the anticoagulants bromadiolone and coumatetralyl in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the UK and Germany. *Int J Pest Manag* 53:285-290
- EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14 : 2611-2620
- FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genet* 164 : 1567–1587
- FAO Stat ([http://faostat3.fao.org/home/index\\_fr.html?locale=fr#HOME](http://faostat3.fao.org/home/index_fr.html?locale=fr#HOME))
- FICHET-CALVET E, PRADIER B, QUERE JP, GIRAUDOUX P, DELATTRE P (2000) Landscape composition and vole outbreaks: evidence from an eight year study of *Arvicola terrestris*. *Ecograph* 23: 659–668

- FISHER P, O'CONNOR C, WRIGHT G, EASON CT (2003) Persistence of four anticoagulant rodenticides in the livers of laboratory rats. DOC Sci Intern Ser 139, Wellington
- FISHER POC C, WRIGHT G, EASON CT (2004) Anticoagulant residues in rats and secondary non-target risk. DOC Sci Intern Ser 188, Wellington
- FISHER P, EASON CT, O'CONNOR CE, LEE CH, SMITH GB, ENDEPOLS S (2003) Coumatetralylresidues in rodents and secondary poisoning hazard to barn owls. In: Rats, Mice and people: rodent biology and management. ACIAR Monograph No 96. (Ed: SINGLETON GR, HINDS LA, KREBS CJ, SPARRT DM) Aust Cent Int Agric Res, Canberra: pp 457–460
- FOSTER WA, SNADDON JL, TURNER EC, FAYLE TM, COCKERILL TD, et al. (2011) Establishing the evidence base for maintaining biodiversity and ecosystem function in the oil palm landscapes of South East Asia. Phil Trans R Soc B 366 : 3277-3291
- GALLEY KEM, WILSON TP (eds) Proceedings of the Invasive Plant Workshop: The Role of Fire in the Control and Spread of Invasive Species. Tallahassee (FL): Tall Timbers Res Station. Pages: 81–94.
- GAGE BF, EBY C, JOHNSON JA, DEYCH E, RIEDER MJ, RIDKER PM, et al. (2008) Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. Clin Pharmacol Ther 84:326-331
- GARZA JC, WILLIAMSON EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. Mol Ecol 10 : 305–318
- GAUFFRE B, PETIT E, BRODIER S, BRETAGNOLLE V, COSSON JF (2009) Sex-biased dispersal patterns depend on the spatial scale in a social rodent. Proc Biol Sci 276 : 3487-94
- GILABERT A, LOISEAU A, DUPLANTIER J-M, RAHELINIRINA S, RAHALISON L, et al. (2007) Genetic structure of black rat populations in a rural plague focus in Madagascar. Can J Zool 85:965-972
- GIRAUDOUX P, DELATTRE P, HABERT M, QUERRE JP, DEBLAY S, et al. (1997) Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris scherman*): a land use and landscape perspective. Agric Ecosyst Environ 66 : 47-60
- GONG X, GUTALA R, JAISWAL AK (2008) Quinone oxidoreductases and vitamin K metabolism. Vitam Horm 78: 85-101.
- GOODSTADT L, PONTING CP (2004) Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. Trends Biochem Sci 29: 289-292
- GOROG AJ, SINAGA MH, ENGSTROM MD (2004) Vicariance or dispersal? Historical biogeography of three Sunda shelf murine rodents (*Maxomys surifer*, *Leopoldamys sabanus* and *Maxomys whiteheadi*). Biol J Linnean Soc 81 : 91-109
- GOUDET J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet J (1995) FSTAT v-1.2. A computer program to calculate F-statistics. J Hered 86:485-486

- GOUY M, GUINDON S, GASCUEL O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221-224
- GRANDEMANGE A, LASSEUR R, LONGIN-SAUVAGEON C, BENOIT E, BERNY P (2010) Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manag Sci* 66:270-276
- GRANDEMANGE A, KOHN MH, LASSEUR R, LONGIN-SAUVAGEON C, BERNY P, BENOIT E (2009) Consequences of the Y139F Vkorc1 mutation on resistance to AVKs: *in-vivo* investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet Genomics* 19:742-750
- GRAY RD, DRUMMOND AJ, GREENHILL SJ (2009) Language Phylogenies Reveal Expansion Pulses and Pauses in Pacific Settlement. *Sci* 323 : 479-483
- GREAVES JH, REDFERN R, ANASUYA B (1976) Inheritance of resistance to warfarin in *Rattus rattus* L. *J St Prod Res* 1: 225-228
- GUENGERICH FP , DANNAN G, WRIGHT ST, MARTIN MV, KAMINSKY LS (1982) Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. *Biochem* 21: 6019–6030
- HAFIDZI MN, SAAYON MK (2001) Status of rat infestation and recent control strategies in oil palm plantations in peninsular malaysia. *J Trop Agric Sci* 24 : 109-114
- HALL TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98
- HARDY OJ, VEKEMANS X (2002) spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol* 2 : 618-620
- HARRIS DB (2009) Review of negative effects of introduced rodents on small mammals on islands. *Biol Invasions* 11: 1611-1630
- HAUSDORF B, HENNIG C (2010) Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Syst Biol* 59: 491-503
- HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, DEWAARD JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond Ser B* 270:313-321
- HEIBERG AC (2009) Anticoagulant resistance: a relevant issue in sewer rat (*Rattus norvegicus*) control? *Pest Manag Sci* 65:444-449
- HEIBERG AC, LEIRS H, SIEGISMUND HR (2006) Reproductive success of bromadiolone-resistant rats in absence of anticoagulant pressure. *Pest Manag Sci* 62:862–871
- HERBRETEAU V, JITTAPALAPONG S, RERKAMNUAYCHOKE W, CHAVAL Y, COSSON JF, MORAND S (2011) Protocols for field and laboratory rodent studies. Kasetsart University Press, Bangkok, Thailand. 46 p.

- HERMODSON MA, SUTTIE JW, LINK KP (1969) Warfarin metabolism and vitamin K requirement in the warfarin resistant rat. *Am J Physiol* 217:1316-1319
- HOUGHTON JT, CALLANDER BA, VARNEY SK, eds. (1992) *Climate Change 1992: The Supplementary Report to the IPCC Scientific Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge.
- HOWALD G, DONLAN CJ, GALVÁN JP, RUSSELL JC, PARKES J *et al.* (2007) Invasive Rodent Eradication on Islands. *Conserv Biol* 21: 1258–1268
- HUANG BH, FENG ZY, YUE LF, YAO DD, GAO ZX, WANG DW, LIU XH (2011) Warfarin resistance test and polymorphism screening in the *VKORC1* gene in *Rattus flavipectus*. *J. Pest Sci.* 84:87-92
- HULME PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *J Appl Ecol* 46: 10–18
- ISHIZUKA M, TANIKAWA T, TANAKA KD, HEEWON M, OKAJIMA F (2008) Pesticide resistance in wild mammals - Mechanisms of anticoagulant resistance in wild rodents. *J Toxicol Sci* 33 : 283-291
- ISHIZUKA M, OKAJIMA F, TANIKAWA T, MIN H, TANAKA KD, SAKAMOTO KQ, FUJITA S (2007) Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab Dispos* 35:62-66
- IUCN (2012) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. (<http://www.iucnredlist.org>)
- JACOB HJ, BROWN DM, BUNKER RK *et al.* (1995) A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat Genet* 9 : 63–69
- JÄKEL T, KHOPRASERT Y, PROMKERD P, HONGNARK S (2006) An experimental field study to assess the effectiveness of bait containing the parasitic protozoan *Sarcocystis singaporensis* for protecting rice crops against rodent damage. *Crop Protection* 25: 773–780
- JAKOBSSON M, ROSENBERG NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinforma* 23: 1801-1806
- JARNE P, LAGODA PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11 : 424–429
- KEARNEY M. (2006) Habitat, environment and niche: what are we modelling? *Oikos* 115: 186–191
- KÉRY M (2011) Towards the modelling of true species distributions. *J Biogeogr* 38: 617–618
- KIMURA M (1953) ‘Stepping stone’ model of population. *Annu Rep Natl Inst Genet Jpn* 3 : 62–63
- KIMURA M, WEISS GH (1964) Stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49 : 561–576

- KOHN MH, PRICE RE, PELZ HJ (2008) A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant *Vkorc1* mutant rats. *Artery Res* 2:138-147
- KOHN MH, PELZ HJ, WAYNE RK (2000) Natural selection mapping of the warfarin-resistance gene. *Proc Natl Acad Sci* 97 : 7911-7915
- KOLAR CS, LODGE DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol Evol* 16: 199–204
- LASSEUR R, LONGIN-SAUVAGEON C, VIDEMANN B, BILLERET M, BERNY P, BENOIT E (2006) Warfarin resistance in a french strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol* 19 : 379–385
- LEUNG L, SETH S, STARR CR, SOTHEARY E, RUSSELL IW *et al.* (2007) Selecting bait base to increase uptake of zinc phosphide and warfarin rodenticide baits. *Crop Prot* 26: 1281-1286
- LEKAGUL B, MAC NEELY JA (1988) Mammals of Thailand. Association for the conservation of wildlife. Bangkok, Thailand pp758
- LI W, SCHULMAN S, DUTTON RJ, BOYD D, BECKWITH J, RAPOPORT TA (2010) Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nat* 463:507-512
- LI T, CHANG C-Y, JIN D-Y, LIN P-J, KHVOROVA A, STAFFORD DW (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nat* 427:541-544
- LIAU SS (1990) Rat population in oil palm replants and crop loss assessment. In: Proceedings of Third International Conference on Plant Protection in the Tropics; 20–23 March 1990, Pahang, Malaysia. MAPPS, Kuala Lumpur, pp. 1–19.
- LOISEAU A, RAHELINIRINA S, RAHALISON L, KONECNY A, DUPLANTIER JM, BROUAT C (2008), Isolation and characterization of microsatellites in *Rattus rattus*. *Mol Ecol Resour* 8: 916–918
- LOISELLE BA, SORK VL, NASON J, GRAHAM C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot* 82:1420-1425
- LOWE S, BROWNE M, BOUDJELAS S (2000) 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. Page 11. Invasive Species Specialist Group, Auckland
- LUIKART GH, ALLENDORF FW, CORNUET J-M, SHERWIN WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238-247
- LUM KJ, MCINTYRE JK, GREGER DL, HUFFMAN KW, VILAR MG(2006) Recent Southeast Asian domestication and Lapita dispersal of sacred male pseudohermaphroditic “tuskers” and hairless pigs of Vanuatu. *Proc Nat Acad Sci* 103 : 17190–17195
- LUND M (1984) Resistance to the second-generation anticoagulant rodenticides. *Proc Vertebr Pest Conf IIth*: 89-94
- MARYANTO I, KARTONO AP, SINAGA MAH (2000) Survey of mammals on different land use types. In: Gillison AN (ed) Above ground biodiversity assessment working group summary report

1996–1999: impact of different land uses on biodiversity and social indicators. ASB Working Group Report, ICRAF, Nairobi

MARKUSSEN MDK, HEIBERG AC, FREDHOLM M, KRISTENSEN M (2008) Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: a possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance. *Pest Manag Sci* 64: 239–248

MARKUSSEN MD, HEIBERG AC, ALSBO C, NIELSEN PS, KAUPPINEN S, KRISTENSEN M (2007) Involvement of hepatic xenobiotic related genes in bromadiolone resistance in wild Norway rats, *Rattus norvegicus* (Berk.). *Pestic Biochem Physiol* 88 : 284-295

MARKUSSEN MDK, HEIBERG AC, NIELSEN R, LEIR H (2003) Vitamin K requirement in Danish anticoagulant-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*) *Pest Manag Sci* 59 : 913-920

MARTIN AD, STEED LC, REDFERN R, GILL JE, HUSON LW (1979) Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Lab Anim* 13 : 209-214

MATISOO-SMITH E, ROBINS JH (2004) Origins and dispersals of Pacific peoples: Evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat. *Proc Natl Acad Sci* 101: 9167–9172

MILLS JN, CHILDS JE (1998) Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg Infect Dis* 4:529-537

MLADENOVIC M, MIHAILOVI M, BOGOJEVI D, VUKOVI N, SUKDOLAK S *et al.*(2012) Biochemical and pharmacological evaluation of 4-hydroxychromen-2-ones bearing polar C-3 substituents as anticoagulants. *Eur J Med Chem* 54: 144-158

MUSSER G, CARLETON M (2005) Superfamily Muroidea. In: Wilson DE, Reeder DM (ed) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore pp 894-1531

MOONEY HA, HOBBS RJ (eds) (2000) *Invasive species in a changing world*. Island Press, Washington DC.

MORA MS, MAPELLI FJ, GAGGIOTTI OE, KITTLEIN MJ, LESSA EP (2010) Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC* 11: 9

MYERS PR, ESPINOSA CS, PARR T, JONESHAMMOND GS, DEWEY TA (2012) The Animal Diversity Web (online). Accessed at <http://animaldiversity.org>.

MYERS JH, SIMBERLOFF D, KURIS AM, CAREY JR (2000) Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends Ecol Evol* 15 : 316–320

National Geographic Television (2009) *Rat Attack*. Inc and WGBH Educational Found

NEI M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321–3323

- NELSON DR (2009) The cytochrome p450 homepage. Hum Genomics 4: 59-65.  
<http://drnelson.uthsc.edu/rat.FASTA.htm>
- NETELER M, BOWMAN MH, LANDA M, METZ M (2012) GRASS GIS: a multi-purpose Open Source GIS. Environ Model Softw 31: 124-130
- NORMILE D (2010) Holding back a torrent of rats. Sci 327:806-807
- NUMATA S, OKUDA T, SUGIMOTO T, NISHIMURA S, YOSHIDA K, SUPARDI MN (2003) Mammals in a tropical rain forest and adjacent fragmented forests, in Peninsular Malaysia. Research Report of the NIES/FRIM/UPM/ Joint Research Project 2002, 35-47
- O'CONNOR CE, EASON CT, ENDEPOLS S (2003) Evaluation of secondary poisoning hazards to ferrets and weka from the rodenticide coumatetralyl. Wildl Res 30:143-146
- OLDENBURG J, WATZKA M, ROST S, MULLER CR (2007) VKORC1: molecular target of coumarins. J Thromb Haemost 5:1-6
- OSTFELD RS, HOLT RD (2004) Are predators good for your health? Evaluating evidence for top-down regulation of zoonotic disease reservoirs. Front Ecol Environ 2:13-20
- PAGES M, CHAVAL Y, HERBRETEAU V, WAENGSOETHORN S, COSSON JF, *et al.* (2010) Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. BMC Evolut Biol 10:184
- PANWAR P (2008) Bamboo and famine. Curr Sci 94:1547
- PARTRIDGE GG (1980) The vitamin-K requirements of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) resistant to warfarin. Comp Biochem Physiol 66: 3-7
- PASCAL M, SIORAT F, LORVELEC O, YÉSOU P, SIMBERLOFF D (2005) A pleasing consequence of Norway rat eradication: two shrew species recover. Divers Distrib 11:193–198
- PAYNE JCM, FRANCIS CM, PHILLIPPS K (1985) A field guide to the mammals of Borneo. The Sabah Society, Kota Kinabalu, Malaysia
- PEAKALL R, RUIBAL M, LINDENMAYER DB (2003) Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the australian bush rat, *rattus fuscipes*. Evol 57 : 1182–1195
- PELZ H-J, ROST S, HUENERBERG M, FREGIN A, HEIBERG AC, *et al.* (2005) The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. Genet 170:1839-1847
- PALSBOLL PJ, BERUBE M, ALLENDORF FW (2007) Identification of management units using population genetic data. Trends Ecol Evol 22 : 11-16
- PLYUSNINA A, IBRAHIM IN, PLYUSNIN A (2009) A newly recognized hantavirus in the Asian house rat (*Rattus tanezumi*) in Indonesia. J Gen Virol 90:205-209
- PostGIS Version 1.2 (2007) Refrations Research Inc., Victoria, British Columbia, Canada.  
<http://postgis.refrations.net/>

- POMPANON F, BONIN A, BELLEMAIN E, TABERLET P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 6: 847-859
- PRENTIS PJ, WILSON JRU, DORMONTT EE, RICHARDSON DM, LOWE AJ (2008) Adaptive evolution in invasive species. *Trends Plant Sci* 13 : 288–294
- PRESCOTT CV (2003) A reappraisal of blood clotting response tests for anticoagulant resistance and a proposal for a standardised BCR test methodology. RRAC, Tech monogr 2003, Croplife Int, Brussel. [http://www.rrac.info/downloads/technical\\_monograph\\_2003\\_BCR.pdf](http://www.rrac.info/downloads/technical_monograph_2003_BCR.pdf)
- PRESCOTT CV, BUCKLE AP (2000) Blood-clotting response tests for resistance to diphacinone and chlorophacinone in the Norway Rat (*Rattus norvegicus* Berk.). *Crop Prot* 19:291-296
- PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet* 155 : 945–959
- PUAN CL, BAXTER GS, GOLDIZEN AW, ZAKARIA M, HAFIDZI MN (2012) Barn owl predatory behavior and response to prey abundance: towards an ecologically-based agricultural practice. *Ornis Mongolica* 1: 63-66
- Quantum GIS (2011). Système d'Information Géographique, Projet de l'Open Source Geospatial Foundation. <http://qgis.osgeo.org>
- QUELLER DC, STRASSMANN JE, HUGHES CR (1993) Microsatellites and kinship. *Trends Ecol Evol* 8 : 285–288
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2006) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- RATNASINGHAM S, HEBERT PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7:355–364
- RAYMOND M, ROUSSET F (1995) GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86 : 248–249
- RENAUD S, MICHAUX JR (2003) The latitudinal gradient in mandible shape observed in the three species of wood mice is interpreted as an intraspecific adaptive response to gradual changes in feeding behaviour. *J Biogeogr*, 30: 1617–1628
- REY O, ESTOUP A, VONSHAK M, LOISEAU A, BLANCHET S *et al.* (2012) Where do adaptive shifts occur during invasion? A multidisciplinary approach to unravelling cold adaptation in a tropical ant species invading the Mediterranean area. *Ecol Lett* 15: 1266–1275
- RICHARDS CL, BOSSDORF O, MUTH NZ, GUREVITCH G, PIGLIUCCI M (2006) Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecol Lett* 9: 981–993
- RICHARDSON DM, PYŠEK P, REJMÁNEK M, BARBOUR MG, PANETTA FD, WEST CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Divers Distrib* 6: 93–107

- RICKART EA, HEANEY LR, BALETE DS, TABARANZA BR (2011) Small mammal diversity along an elevational gradient in northern Luzon, Philippines. *Mam Biol* 76 : 12-21
- RISHAVY M A, USUBALIEVA A, HALLGREN KW, BERKNER KL (2010) Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *J Biol Chem* 286: 7267-7278
- RIST L, FEINTRENIE L, LEVANG P (2010) The livelihood impacts of oil palm: smallholders in Indonesia. *Biodivers Conserv* 19:1009-1024
- ROBERTSON BC, GEMMELL NJ (2004) Defining eradication units to control invasive pests. *J Appl Ecol* 41 : 1042–1048
- ROBINS JH, HINGSTON M, MATISOO-SMITH E, ROSS HA (2007) Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Mol Ecol Notes* 7:717-729
- ROGERS SL, KOOKANA RS, OLIVER DP, RICHARDS A (1998) Microbial degradation of strychnine rodenticide in south australian agricultural soils: laboratory studies. *Soil Biol Biochem* 30 : 129-134
- ROLLINS LA, WOOLNOUGH A, SHERWIN WB (2006) Population genetic tools for pest management: A review. *Wildl Res* 33 : 251–261
- ROST S, PELZ HJ, MENZEL S, MACNICOLL A, LEON V, *et al.* (2009) Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice - a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet* 10:4
- ROST S, FREGIN A, HUNERBERG M, BEVANS CG, MULLER CR, OLDENBURG J (2005) Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant sensitive VKORC1. *Thromb Haemost* 94:780-786
- ROST S, FREGIN A, IVASKEVICIUS V, CONZELMANN E, HORTNAGEL K, *et al.* (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nat* 427:537-541
- ROUSSET F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resources* 8 : 103-106
- RUNGE M, VON KEYSERLINGK M, BRAUNE S, BECKER D, PLENGE-BÖNIG A, *et al.* (2012) Distribution of rodenticide resistance and zoonotic pathogens in Norway rats in Lower Saxony and Hamburg, Germany. *Pest Manag Sci*. doi: 10.1002/ps.3369.
- RUSSELL JC, TOWNS DR, ANDERSON SH, CLOUT MN (2005) Intercepting the first rat ashore. *Nat* 437: 1107
- SAGE M, COEURDASSIER M, DEFAUT R, GIMBERT F, BERNY P, GIRAUDOUX P (2008) Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of the water vole, *Arvicola terrestris*. *Sci Total Environ* 407 : 211-222

- SALIBAY CC, LUYON HAV (2008) Distribution of native and non-native rats (*rattus spp.*) along an elevational gradient in a tropical rainforest of southern Luzon, Philippines. *Ecotropica* 14: 129–136
- SAX DF, BROWN JH (2000) The paradox of invasion. *Glob Ecol Biogeogr* 9 : 363-371
- SCHULMAN S, WANG B, LI W, RAPOPORT TA (2010) Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proc Natl Acad Sci* 107: 15027–15032
- SCHAAFHAUSEN A, ROST S, OLDENBURG J, MÜLLER CR (2011) Identification of VKORC1 interaction partners by split-ubiquitin system and coimmunoprecipitation. *Thromb Haemost* 105: 285-94
- SCHWARZ R, SEIBEL PN, RAHMANN S, SCHOEN C, *et al.* (2009) Detecting species-site dependencies in large multiple sequence alignments. *Nucl Acids Res* 37: 5959–5968
- SHEA K, CHESSON P (2002) Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends Ecol Evol* 17 : 170–176
- SINGLETON GR, SUDARMAJI, JACOB J, KREBS CJ (2005) Integrated management to reduce rodent damage to lowland rice crops in Indonesia. *Agric Ecosyst Environ* 107:75-82
- SINGLETON GR, HINDS LA, KREBS CJ, SPRATT DM (2003a) Rats, mice and people: rodent biology and management. *Aust Cent Int Agric Res, Canberra*. <http://www.aciar.gov.au/publication/MN096>
- SINGLETON GR, SMYTHE L, SMITH G, SPRATT DM, ALPIN K, SMITH AL (2003b) Rodent diseases in Southeast Asia and Australia: inventory of recent surveys. In: *Rats, Mice and people: rodent biology and management*. ACIAR Monograph No 96. (Ed: SINGLETON GR, HINDS LA, KREBS CJ, SPARRT DM) *Aust Cent Int Agric Res, Canberra*: pp24-29
- SIGURET V (2007) Antivitamines k et pharmacogénétique : vers une meilleure compréhension de la variabilité individuelle de l'effet dose-réponse. *Pathol Biol* 55 : 295–298
- SONG Y, ENDEPOLS S, KLEMANN N, RICHTER D, MATUSCHKA FR *et al.* (2011) Adaptive Introgression of Anticoagulant Rodent Poison Resistance by Hybridization between Old World Mice. *Curr Biol* 21 : 1296–1301
- SPENCER PBS, WOOLNOUGH AP (2004) Size should matter: distribution and genetic consideration for pest animal management. *Ecol Manag Restor* 5 : 231–232
- SRODA S, COSSU-LEGUILLE C (2011) Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? *Ecotoxicol* 20:264-273
- STAFFORD DW (2005) The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* 3 : 1873-1878
- SUTTIE JW (1987) The biochemical basis of warfarin therapy. *Adv Exp Med Biol* 214:3-16
- SUTTIE JW (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem* 54: 459–77

- SWINCER DE (1986) Physical characteristics of sites in relation to invasion. In: Ecology of biological invasions (eds R.H.Groves & J.J.Burdon). Cambridge University Press, London.
- TAKEUCHI F, MCGINNIS R, BOURGEOIS S, BARNES C, ERIKSSON N, *et al.* (2009) A genome-wide association study confirms *VKORC1*, *CYP2C9*, and *CYP4F2* as principal genetic determinants of warfarin dose. PLoS Genet 5:e1000433
- THOENES P (2006) Biofuels and commodity markets — palm oil focus. FAO, Commodities and Trade Division, 2006.
- TIE JK, JIN DY, STAFFORD DW (2012) Human vitamin K epoxide reductase and its bacterial homologue have different membrane topologies and reaction mechanisms. J Biol Chem. doi:10.1074/jbc.M112.402941
- TIE JK, JIN DY, STRAIGHT DL, STAFFORD DW (2011) Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. Blood 117: 2967-2974
- TIE JK, STAFFORD DW (2008) Structure and function of vitamin K epoxide reductase. Vitam Horm 78: 103-130
- TIE JK, NICCHITTA C, HEIJNE G, STAFFORD DW (2005) Membrane Topology Mapping of Vitamin K Epoxide Reductase by in Vitro Translation/Cotranslocation. J Biol Chem 280 : 16410-16416
- TROMBULAK SC, FRISSELL CA (2001) Review of Ecological Effects of Roads on Terrestrial and Aquatic Communities. Conserv Biol 14 : 18-30
- TYLIANAKIS JM, DIDHAM RK, BASCOMPTE J, WARDLE DA (2008) Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. Ecol Lett 11 : 1351-1363
- VAN AUKEN OW (2000) Shrub invasions of North American semiarid grasslands. Annu Rev Ecol Syst 31:197–215.
- VAN OOSTERHOUT C, HUTCHINSON W, WILLS D, SHIPLEY P (2004) Micro-checker : software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4 : 535-538
- VANDENBROUCKE V, BOUSQUET-MELOU A, DE BACKER P, CROUBELS S (2008) Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. J Vet Pharmacol Ther 31:437-445
- VEIN J, GRANDEMANGE A, COSSON JF, BENOIT E, BERNY P (2011) Are water vole resistant to anticoagulant rodenticides following field treatments? Ecotoxicol 20:1432-1441
- VEKEMANS X, HARDY OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. Mol Ecol 13 : 921-935
- VERMEULEN S, GOAD N (2006) Towards better practice in smallholder palm oil production. Natural resource issues series n° 5. London, UK : International Institute for Environment and Development, 2006.

- VERES A, PETIT S, CONORD C, LAVIGNE C (2011) Does landscape composition affect pest abundance and their control by natural enemies? A review. *Agric Ecosyst Environ*. Doi : 10.1016/j.agee.2011.05.027
- VERHOEVEN KJF, SIMONSEN KL, MCINTYRE LM (2005) Implementing false discovery rate control: increasing your power. *Oikos* 108 : 643-647
- VILÀ M, WEINER J (2004) Are invasive plant species better competitors than native plant species? – evidence from pair-wise experiments. *Oikos* 105: 229–238
- WALKER LA, TURK A, LONG SM, WIENBURG CL, BEST J, SHORE RF (2008) Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Sci Total Environ* 392:93-98
- WAJIH N, HUTSON SM, WALLIN R (2007) Disulfide-dependent Protein Folding Is Linked to Operation of the Vitamin K Cycle in the Endoplasmic Reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem* 282 : 2626-2635
- WAJIH N, SANE DC, HUTSON SM, WALLIN R (2005) Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxyglutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system. *J Biol Chem* 280 : 10540–10547
- WAJIH N, SANE DC, HUTSON SM, WALLIN R (2004) The Inhibitory Effect of Calumenin on the Vitamin K-dependent  $\gamma$ -Carboxylation System. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem* 279 : 25276-25283
- WALLIN R, HUTSON SM (2004) Warfarin and the vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation system. *Trends Mol Med* 10:299-302
- WALLIN R, MARTIN LF (1987) Warfarin poisoning and vitaminK antagonism in rat and human liver. Design of a system in vitro that mimics the system in vivo. *Biochem J* 241 : 389–396
- WALTHER GR, POST E, CONVEY P, MENZEL A, PARMESAN C, *et al.* (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416: 389–395.
- WANG J, FENG Z, YAO D, SUI J, ZHONG W, LI M, DAI J (2008) Warfarin resistance in *Rattus losea* in Guangdong Province, China. *Pestic Biochem Physiol* 91:90-95
- WATANABE KP, SAENGTIENCHAI A, TANAKA KD, IKENAKA Y, ISHIZUKA M (2010) Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 152:114-119
- WEIR BS (1996) *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 376p
- WEIR BS, COCKERHAM CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evol* 38 : 1358–1370

- WESTERMANA M, KEARA BP, APLINC K, MEREDITHD RW, EMERLINGD C, SPRINGERD MS (2012) Phylogenetic relationships of living and recently extinct bandicoots based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 62: 97-108
- WESTHOFEN P, WATZKA M, MARINOVA M, HASS M, KIRFEL G et al. (2011) Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J Biol Chem* 286: 15085-15094
- WHITTEN T, DAMANIK SJ, ANWAR J, HISYAM N (2000) Uncommon lowland forests. In: Periplus (ed) *The ecology of Sumatra*. pp 253-276
- WILLIAMSON M, FITTER A (1996) The varying success of invaders. *Ecol* 77: 1661–1666
- WILSON DE, REEDER DM (2005) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore
- WOOD BJ, FEE CG (2003) A critical review of the development of rat control in Malaysian agriculture since the 1960s. *Crop Prot* 22:445-461
- WOOD BJ, LIAU SS (1984) A long-term study of *Rattus tiomanicus* populations in an oil palm plantation in Johore, Malaysia: II. Recovery from control and economic aspects. *J Appl Ecol* 21: 465–72
- WOOD BJ, LIAU SS (1978) Rats as agricultural pests in Malaysia and the tropics. *Planter* 54: 580–599
- WRIGHT S (1978) *Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, 465 pp.
- WRIGHT S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15 : 323–354.
- WRIGHT S (1946) Isolation by Distance under Diverse Systems of Mating. *Genet* 31 : 39-59
- WRIGHT S (1943) Isolation by distance. *Genet* 28 : 114–138
- WU S, LIU S, DAVIS CH, STAFFORD DW, KULMAN JD, PEDERSEN LG (2011) A hetero-dimer model for concerted action of vitamin K carboxylase and vitamin K reductase in vitamin K cycle. *J Theor Biol* 279:143-149
- YUAN HY, CHEN JJ, LEE MTM, WUNG JC, CHEN YF, *et al.* (2005) A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 14:1745-1751
- ZIMMERMANN A, MATSCHINER JT (1974) Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. *Biochem. Pharmacol* 23: 1033-1040