



**HAL**  
open science

## Polymorphisme du gène VKORC1 chez bos taurus : influence de l'exposition au féruléol

Anna Albistur

► **To cite this version:**

Anna Albistur. Polymorphisme du gène VKORC1 chez bos taurus : influence de l'exposition au féruléol. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-03727156

**HAL Id: dumas-03727156**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03727156v1>**

Submitted on 12 Jan 2023

**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.

**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 – Thèse n°019

**POLYMORPHISME DU GENE *VKORC1* CHEZ *BOS TAURUS*  
INFLUENCE DE L'EXPOSITION AU FÉRULÉNOL**

**THESE**

Présentée à l'université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 30 juin 2022  
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par  
ALBISTUR Anna



<b>Liste des enseignants du Campus vétérinaire de Lyon (26-01-2022)</b>			
Mme	ABITBOL	Marie	Professeur
M.	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Mme	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Mme	BECKER	Claire	Maître de conférences
Mme	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Mme	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Professeur
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
M.	BRUTO	Maxime	Maître de conférences Stagiaire
M.	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
M.	BUFF	Samuel	Professeur
M.	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
M.	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
M.	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Mme	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
M.	CHABANNE	Luc	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
M.	CHAMEL	Gabriel	Maître de conférences
M.	CHETOT	Thomas	Maître de conférences Stagiaire
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Maître de conférences
Mme	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Mme	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
M.	GALIA	Wessam	Maître de conférences
M.	GILLET	Benoit	AERC
Mme	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Mme	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
M.	JUNOT	Stéphane	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Professeur
Mme	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Mme	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Professeur
Mme	LEBLOND	Agnès	Professeur
Mme	LEDOUX	Dorothee	Maître de conférences
M.	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Mme	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
M.	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Professeur

Mme	LOUZIER	Vanessa	Professeur
M.	LURIER	Thibaut	Maître de conférences Stagiaire
M.	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences Stagiaire
M.	MARCHAL	Thierry	Professeur
Mme	MOSCA	Marion	Maître de conférences
M.	MOUNIER	Luc	Professeur
Mme	PEROZ	Carole	Maître de conférences
M.	PIN	Didier	Professeur
Mme	PONCE	Frédérique	Professeur
Mme	PORTIER	Karine	Professeur
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Maître de conférences
Mme	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Mme	REMY	Denise	Professeur
Mme	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
M.	ROGER	Thierry	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
M.	SCHRAMME	Michael	Professeur
Mme	SERGENTET	Delphine	Professeur
M.	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Mme	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Chargé d'enseignement contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Professeur

## Remerciements à mon jury

### A Monsieur le Professeur Alain Calender

de l'Université Claude Bernard – Lyon 1, faculté de médecine de Lyon Est,

Pour m'avoir fait l'honneur et avoir pris le temps de présider ce jury de soutenance de thèse,

Mes hommages respectueux

### A Madame le Docteur Véronique Lambert

de VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon, service de génétique

Pour m'avoir proposé d'intégrer ce projet d'étude passionnant, pour votre bienveillance, pour votre confiance, et pour tout le reste,

Mes remerciements les plus sincères

### A Monsieur le Docteur Thomas Chetot

de VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon, service de Biochimie

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury, pour tes conseils et ta gentillesse au cours de mes manipulations en laboratoire,

Mes sincères remerciements

### A Monsieur le Docteur et ingénieur d'étude Abdessalem Hammed

de VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon

Pour m'avoir fait une petite place dans ton bureau pour ce projet semé d'embûches, pour ton aide, ta disponibilité et ta patience, pour ta gentillesse, pour absolument tout. Je te souhaite le meilleur pour la suite, plein de bonheur.

Mes remerciements les plus sincères et chaleureux







# Table des matières

<u>Table des annexes</u>	<u>13</u>
<u>Table des figures</u>	<u>15</u>
<u>Table des tableaux</u>	<u>17</u>
<u>Liste des abréviations</u>	<u>19</u>
<u>Introduction</u>	<u>21</u>

## *PARTIE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE – Place du gène VKORC1 dans la coagulation et présentation du contexte d'étude*

<u>I. La coagulation chez les animaux</u>	<u>25</u>
<b><u>I.a. L'hémostase</u></b>	<b><u>25</u></b>
I.a.1. L'hémostase primaire _____	26
I.a.2. Hémostase secondaire _____	28
I.a.3. Les mécanismes de contrôle de la coagulation : inhibition physiologique __	33
I.a.4. Fibrinolyse _____	34
<b><u>I.b. La vitamine K</u></b>	<b><u>36</u></b>
I.b.1. Découverte de la vitamine K _____	36
I.b.2. Structure et sources de la vitamine K _____	37
I.b.2.i. Les sources alimentaires de vitamine K _____	38
I.b.2.ii. Les sources non alimentaires de vitamine K _____	38
I.b.3. Le métabolisme de la vitamine K _____	38
I.b.3.i. L'absorption de la vitamine K _____	38
I.b.3.ii. La distribution de la vitamine K _____	39
I.b.3.iii. L'élimination des vitamines K _____	40
I.b.4. Cycle de la vitamine K et rôle dans l'organisme _____	40
I.b.4.i. Le rôle biologique des protéines vitamine K – dépendantes (PVKD) _____	42
I.b.4.ii. Implication de la vitamine K dans la santé animale _____	43
I.b.5. VKORC1 : une enzyme importante intervenant dans le cycle de la vitamine K	44

<b>II.</b>	<b><u>Les anticoagulants antivitamine K (AVK)</u></b>	<b>47</b>
<b>II.a.</b>	<b><u>Présentation des différents antivitamine K (AVK) et de leur mécanisme d'action</u></b>	<b>47</b>
<b>II.b.</b>	<b><u>Lien entre les AVK et la médecine vétérinaire</u></b>	<b>49</b>
<b>II.b.1.</b>	<b><u>Utilisation thérapeutique des AVK</u></b>	<b>49</b>
<b>II.b.2.</b>	<b><u>Les intoxications aux AVK</u></b>	<b>52</b>
<b>II.c.</b>	<b><u>Réponses des organismes aux AVK : constat d'une variabilité de réaction chez l'Homme et l'animal</u></b>	<b>55</b>
<b>II.c.1.</b>	<b><u>Le métabolisme des AVK et leurs interactions dans l'organisme</u></b>	<b>55</b>
<b>II.c.2.</b>	<b><u>Mutation du gène <i>VKORC1</i> et résistances aux AVK</u></b>	<b>56</b>
<b>II.c.2.i.</b>	<b><u>Découverte d'un mécanisme de résistance aux AVK</u></b>	<b>56</b>
<b>II.c.2.ii.</b>	<b><u>Présentation du polymorphisme du gène <i>VKORC1</i> chez les rongeurs et l'Homme</u></b>	<b>58</b>

<b>III.</b>	<b><u>Etude de <i>Ferula sp.</i> et rétrospective des cas d'intoxication recensés</u></b>	<b>65</b>
<b>III.a.</b>	<b><u>Caractéristiques botaniques et répartition géographique</u></b>	<b>65</b>
<b>III.b.</b>	<b><u>Composition chimique de la férule et mécanisme d'action du féruléol</u></b>	<b>67</b>
<b>III.b.1.</b>	<b><u>Mise en évidence de la présence de composés coumariniques dans les différentes espèces de <i>Ferula sp.</i></u></b>	<b>67</b>
<b>III.b.2.</b>	<b><u>Le féruléol entraîne l'inhibition de <i>VKORC1</i>, altère la biosynthèse des facteurs de coagulation et présente une cytotoxicité hépatique</u></b>	<b>70</b>
<b>III.c.</b>	<b><u>Etat des lieux sur les utilisations du féruléol et présentation de cas d'intoxications à <i>Ferula sp.</i></u></b>	<b>73</b>

## **PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE – Étude du polymorphisme du gène *VKORC1* chez les bovins (*Bos taurus*)**

### **Introduction**

#### **I. Matériel et méthode**

<b>I.a.</b>	<b><u>Animaux</u></b>	<b>81</b>
<b>I.b.</b>	<b><u>Extraction de l'ADN génomique</u></b>	<b>81</b>
<b>I.c.</b>	<b><u>Amplification par PCR de la séquence du gène <i>VKORC1</i></u></b>	<b>83</b>
<b>I.d.</b>	<b><u>Contrôle de la PCR : électrophorèse sur gel d'agarose</u></b>	<b>85</b>
<b>I.d.1.</b>	<b><u>Electrophorèse sur gel d'agarose</u></b>	<b>85</b>

<b>I.d.2. Contrôle de pureté = dosage A260 nm/ A280 nm</b>	<b>86</b>
<b>I.e. Séquençage des amplicons</b>	<b>87</b>
<b>I.f. Lecture et comparaison des séquences amplifiées</b>	<b>88</b>
<b>I.g. Alignement des séquences protéiques de VKORC1 et prédiction de l'effet des variants SNP</b>	<b>89</b>
<b>II. Résultats</b>	<b>91</b>
<b>II.a. Extraction de l'ADN génomique et amplification du gène VKORC1</b>	<b>91</b>
<b>II.b. Alignement des produits PCR avec la séquence d'intérêt</b>	<b>91</b>
<b>Discussion</b>	<b>99</b>
<b>Au sujet du matériel</b>	<b>99</b>
<b>Au sujet de la méthode</b>	<b>99</b>
<b>Polymorphisme du gène VKORC1</b>	<b>100</b>
<b>Conclusion</b>	<b>107</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>109</b>
<b>Annexes</b>	<b>119</b>



## Table des annexes

<b>Annexe 1</b> : Attestation d'avis favorable au projet expérimental .....	119
<b>Annexe 2</b> : Liste des sujets de l'étude .....	120
<b>Annexe 3</b> : Protocole d'extraction d'ADN génomique avec le kit "Nucleospin Blood QuickPure" .....	122
<b>Annexe 4</b> : Protocole de PCR et séquençage de VKORC1 chez la vache avec de l'Accurpime .....	124
<b>Annexe 5</b> : Protocole d'électrophorèse sur gel d'agarose .....	128
<b>Annexe 6</b> : Classification des acides aminés .....	131
<b>Annexe 7</b> : Traduction des codons de nucléotides en acide aminés .....	132



## Table des figures

<b>Figure 1</b> : Schéma simplifié illustrant le déroulement de l'hémostase .....	25
<b>Figure 2</b> : Plaquettes avec granules cytoplasmiques (MET x1000) .....	27
<b>Figure 3</b> : Illustration des mécanismes mis en jeu lors de l'hémostase primaire .....	28
<b>Figure 4</b> : Voies d'activation de la cascade de coagulation, représentation historique .....	31
<b>Figure 5</b> : Représentation moderne de la coagulation sanguine en quatre phases .....	33
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique de la fibrinolyse.....	35
<b>Figure 7</b> : Structure chimique des différentes formes de la vitamine K.....	37
<b>Figure 8</b> : Le cycle de la vitamine K .....	41
<b>Figure 9</b> : Représentations schématiques de la protéine VKORC1 selon les deux modèles prédictifs. 45	
<b>Figure 10</b> : Comparaison des noyaux hydroxycoumarines et indandione .....	48
<b>Figure 11</b> : Illustration de l'action des AVK dans le cycle de la vitamine K .....	49
<b>Figure 12</b> : Présentation des différentes prises en charge possibles dans le cadre d'intoxication aux AVK .....	54
<b>Figure 13</b> : Présentation de <i>F. glauca</i> (gauche) et <i>F. communis</i> (droite) .....	66
<b>Figure 14</b> : Répartition géographique de <i>F. communis</i> , <i>F. glauca</i> et <i>F. microcarpa</i> .....	66
<b>Figure 15</b> : Présentation des deux molécules coumariniques présentes dans <i>Ferula</i> sp. ....	68
<b>Figure 16</b> : Présentation des concentration en féruléol et ferprénine en fonction de l'espèce de férule .....	69
<b>Figure 17</b> : Présentation des concentrations en féruléol et ferprénine en fonction de la saison (A), de l'altitude (B) et du type de sol (C).....	69
<b>Figure 18</b> : Comparaison de la survie des lignées cellulaires hépatiques (A : HepG2) et rénales (B : HEK 293) suite à leur exposition au féruléol ou à la warfarine .....	71
<b>Figure 19</b> : Activité de la VitK-ER en présence de féruléol chez différentes espèces (A), et présentation de l'inhibition de VKOR de microsome de foie de veau en présence de féruléol (B), ferprénine (C) et warfarine (D).....	72
<b>Figure 20</b> : Concentrations sanguine en féruléol et dicoumarol chez des bovins corses adultes, sevrés et non sevrés .....	75
<b>Figure 21</b> : Stratégie opératoire de l'étude .....	80
<b>Figure 22</b> : Principe de la chromatographie d'adsorption sur colonne de silice.....	82
<b>Figure 23</b> : Protocole d'extraction d'ADN sur colonne de silice.....	83
<b>Figure 24</b> : Schéma d'amplification du gène VKORC1 en deux PCR chevauchante .....	83
<b>Figure 25</b> : Principe de la PCR.....	85
<b>Figure 26</b> : DNA Ladder (marqueur de poids moléculaire) utilisé pour l'étude.....	86
<b>Figure 27</b> : Schéma du séquençage par la méthode Sanger .....	87

<b>Figure 28</b> : Exemple d'alignement de la séquence d'un échantillon de vache corse par rapport à la séquence de référence à l'aide du logiciel CLC Sequence Viewer .....	88
<b>Figure 29</b> : Résultats d'amplification d'ADN génomique Vkorc1 après révélation par électrophorèse sur gel d'agarose .....	91
<b>Figure 30</b> : Alignement de la séquence de l'exon 1 de la Vc22 [Vache Corse (22)] par rapport à la séquence de référence NM_001003903.3 (ADN vache VKORC1 ATG). .....	92
<b>Figure 31</b> : Alignement de la séquence de l'exon 1 de la Vc23 [Vache Corse (23)] par rapport à la séquence de référence NM_001003903.3 (ADN vache VKORC1 ATG).....	93
<b>Figure 32</b> : Alignement de la séquence de l'exon 2 de la Vc22 [Vache Corse (22)] par rapport à la séquence de référence NM_001003903.3 (ADN vache VKORC1 ATG) = absence de mutation.....	93
<b>Figure 33</b> : Alignement de la séquence de l'exon 3 de la Vc22 [Vache Corse (22)] par rapport à la séquence de référence NM_001003903.3 (ADN vache VKORC1 ATG) .....	94
<b>Figure 34</b> : Alignement des séquences protéiques de VKORC1 de plusieurs espèces, issu du logiciel Multalin .....	96
<b>Figure 35</b> : Prédiction de l'effet du variant p.A34V avec le logiciel Mutpred .....	97
<b>Figure 36</b> : Prédiction de l'effet du variant p.S57C de VKORC1 avec le logiciel Mutpred.....	97
<b>Figure 37</b> : Prédiction à l'aide du logiciel PROVEAN de l'effet des variants protéiques de VKORC1 p.A34V et p.S57C identifiés chez les bovins de race corse et le taureau de race Limousine.....	98
<b>Figure 38</b> : Localisation des acides aminés substitués sur la protéine VKORC1 d'après les modèles à deux ou trois hélices transmembranaires.....	102
<b>Figure 39</b> : Alignement des séquences protéiques de VKORC1 de plusieurs espèces, issu du logiciel CLC sequence Viewer .....	104
<b>Figure 40</b> : Méthode expérimentale de l'expression de l'activité protéique à partir de microsomes hépatiques.....	105
<b>Figure 41</b> : Classement des phénotypes de résistance supposés des animaux en fonction de leur génotype et du caractère récessif ou dominant de l'allèle muté .....	106

## Table des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Liste des différents facteurs de coagulation .....	29
<b>Tableau 2</b> : Liste non exhaustives des PVKD, associées à leur localisation et leur rôle dans l'organisme .....	42
<b>Tableau 3</b> : Présentation de quelques séquences du gène VKORC1 chez différentes espèces animales .....	46
<b>Tableau 4</b> : Liste des AVK utilisés en France .....	50
<b>Tableau 5</b> : Mécanismes d'action, pathogénies et doses létales de quelques AVK chez le chien et le chat.....	53
<b>Tableau 6</b> : Présentation des mutations protéiques de VKORC1 chez <i>Rattus norvegicus</i> .....	59
<b>Tableau 7</b> : Présentation des mutations nucléotidiques et protéique du gène VKORC1 chez l'Homme .....	60
<b>Tableau 8</b> : Présentation des différentes espèces, sous-espèces et variétés de <i>Ferula</i> .....	65
<b>Tableau 9</b> : Concentrations en féruléol et ferprénine de <i>Ferula communis communis</i> prélevées dans différents pays.....	68
<b>Tableau 10</b> : Valeurs des Ki du féruléol, de la ferprénine et de la warfarine, déterminés dans des microsomes hépatiques de différentes espèces.....	72
<b>Tableau 11</b> : Couples d'amorces utilisés pour la PCR.....	84
<b>Tableau 12</b> : Amorces utilisées pour le séquençage.....	87
<b>Tableau 13</b> : Mutations nucléotidiques et protéiques identifiées dans les échantillons .....	95
<b>Tableau 14</b> : Exemple de substitutions protéiques autour de l'acide aminé 57 de la protéine VKORC1 chez l'Homme, le rat et les bovins.....	103



## Liste des abréviations

aa : acide aminé

ADH : hormone antidiurétique = vasopressine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AFSSA : Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments

AMM : autorisation de mise sur le marché

apoE : apoprotéine E

ARN : acide ribonucléique

AT : antithrombine

ATP : adénosine triphosphate

AVK : anti-vitamine K

CIVD : coagulation intra-vasculaire disséminée

ddNTP : didésoxyribonucléotide

DL50 : dose létale 50%

dNTP : désoxyribonucléotide

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

HDL : *high density protein*

HPM : haut poids moléculaire

INR : *international normalized ratio*

ISI : index de sensibilité international

K : vitamine K hydroquinone

kDa : kilodalton

K-n : phylloquinone

KOX : vitamine K 2,3-époxyde

LDL : *low density lipoprotein*

MK-n : ménaquinones

NAP(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NQO1 : NAD(P)H déshydrogénase

PAI : inhibiteur de l'activateur de plasminogène

pb : paire de base

PCa : protéine C activée

PCR : *Polymerase chain reaction*

PDF : produit de la dégradation de la fibrine

PDI : protéine disulfide isomérase

PVKD : Protéines vitamine K – dépendantes

RT-PCR : *reverse transcriptase chaine reaction*

SNP : Single nucleotide polymorphism

TAFI : inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine

TCA : temps de céphaline activée

TF : facteur tissulaire

TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire

TMX : *Thioredoxin-related transmembrane proteins*

tPA : activateur tissulaire du plasminogène

TQ : temps de quick

UBIAD1 : UbiA-prényltransférase bactérienne

uPA : activateur urokinase du plasminogène

VKCFD2 : *Combined vitamin K-dependent clotting factor deficiency type 2*

VKOR : vitamine K époxyde réductase

VKORC1 : *VKOR complex subunit 1* = Vitamine K époxyde réductase sous-unité 1

VKORC1L1 : *VKORC1 like protein 1*

VLDL : *very low density lipoprotein*

vWF : facteur de von Willebrand

## Introduction

Le séquençage de l'ADN est une des étapes primordiales dans l'étude du polymorphisme génétique. Son histoire est complexe en termes d'évolution et de techniques, puisque la communauté scientifique parle d'au moins trois générations de séquençage définies au cours des 50 dernières années. Cependant, l'histoire place les débuts du séquençage nucléotidique en 1977 avec l'apparition de la méthode de Frederick Sanger (1918 – 2013). Ce dernier, double lauréat du Prix Nobel de Chimie en 1958 et 1980, disait que « *la connaissance des séquences d'ADN pourrait énormément contribuer à la compréhension de toute matière vivante* ». A partir de là, les travaux menés en génétique moléculaire ont permis l'identification et le traitement de plusieurs maladies génétiques, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire.

Les recherches sur la protéine et sur le gène Vitamine K époxyde réductase sous-unité 1 (*VKORC1*) ont débutées à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle et se poursuivent encore aujourd'hui. Cette molécule a été identifiée chez de nombreuses espèces, animales et végétales. Les études menées ont permis de comprendre que c'est l'un des principaux acteurs du métabolisme de la vitamine K, étant elle-même un élément indispensable du bon déroulement de la cascade de coagulation en assurant le fonctionnement de certaines protéines : les protéines vitamine K-dépendantes. A ce jour, tous les mécanismes de la coagulation ne sont pas encore identifiés de manière exacte, mais la communauté scientifique s'accorde à dire que le gène *VKORC1* est indirectement impliqué dans de nombreuses fonctions vitales chez les eucaryotes et même procaryotes.

Cependant, certaines molécules pharmacologiques représentent un obstacle au bon fonctionnement du cycle de coagulation, et plus particulièrement les molécules de la catégorie des anticoagulants anti-vitamine K (AVK). Ces molécules agissent en inhibant l'activité enzymatique de *VKORC1*. En médecine humaine, ce type de molécule peut être utilisé comme molécules thérapeutiques dans un contexte de maladie thrombo-emboliques, alors que dans le domaine vétérinaire, elles sont plutôt réservées pour la lutte des contre les rongeurs nuisibles. Mais, en médecine vétérinaire, elles peuvent également être rencontrées dans des cas d'intoxication aux anti-vitamine K chez des animaux dits « non-cibles », tels que les carnivores domestiques. Ces différentes utilisations des anti-vitamine K ont révélé une problématique d'ordre génétique au fil des années, puisque des résistances à ces molécules sont apparues chez les humains comme chez les animaux. Les études sur ces résistances ont mis en évidence un polymorphisme du gène *VKORC1*, qui entraîne une variation d'activité enzymatique et donc une variation de réponse aux molécules à action anti-vitamine K. À ce jour, les recherches se sont principalement concentrées sur le polymorphisme de ce gène chez l'Homme et les rongeurs. Ainsi, il n'existe que très peu de données chez d'autres espèces animales, notamment chez les bovins.

La première partie bibliographique de ce travail vise à présenter le phénomène de coagulation des animaux, en détaillant la place et les rôles de la protéine VKORC1 dans les organismes. Elle permet d'illustrer les mécanismes pharmacologiques et génétiques qui interfèrent dans la coagulation, en abordant les mutations déjà connues du gène *VKORC1*. Enfin, nous réalisons un état des lieux des cas d'intoxications aux anti-coagulants recensés chez différentes espèces animales, notamment ceux associés à la consommation de fêrue, en utilisant le contexte des élevages et des cas d'intoxications rapportés sur l'île de Corse.

La seconde partie de ce manuscrit est une présentation des travaux de recherches conduits dans le cadre de ce travail expérimental dont l'objectif était de caractériser le polymorphisme du gène *VKORC1* chez les bovins en fonction de l'exposition à une molécule anti-coagulante, le féruénuol.

*PARTIE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE*

Place du gène *VKORC1* dans la  
coagulation et présentation du  
contexte d'étude



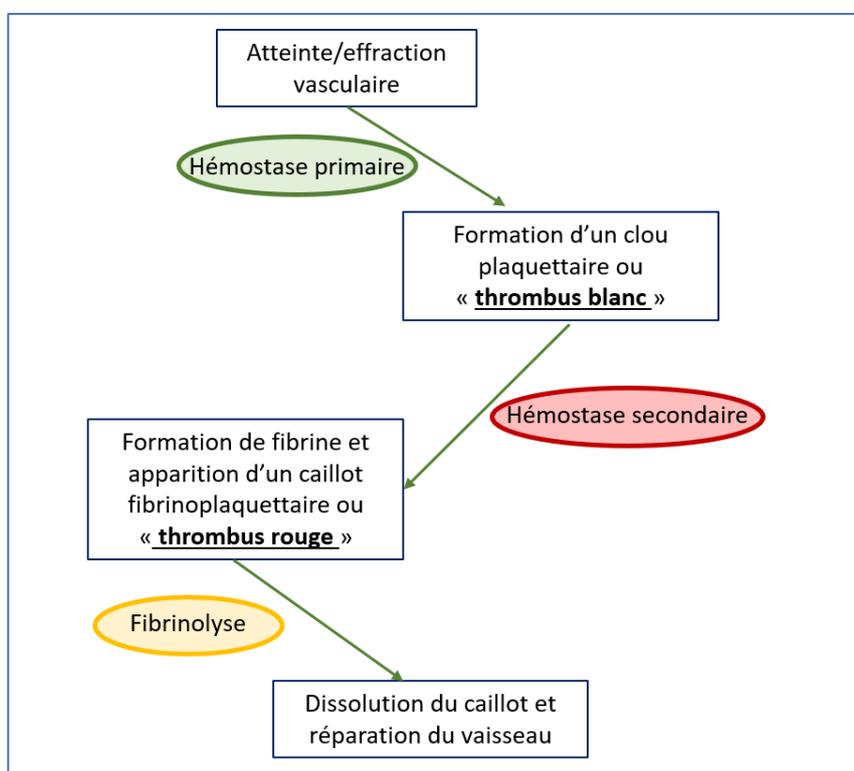
## I. La coagulation chez les animaux

### I.a. L'hémostase

Le mot « hémostase » vient du grec « *haeme* » (sang) et « *statis* » (arrêt) (Palta et al., 2014). Il représente l'ensemble des mécanismes qui permettent, face à des perturbations du système vasculaire, de freiner les saignements tout en maintenant le sang dans un état fluide pour éviter le développement d'hémorragies. Ce mécanisme est retrouvé chez de nombreux être vivants, et évolue avec eux depuis des millions d'années (Davidson et al., 2003).

Physiologiquement, ce mécanisme (figure 1) se décompose en trois phases plus ou moins imbriquées les unes dans les autres (Samama, 2009) :

- L'hémostase primaire : c'est une phase très rapide qui consiste en la formation d'un clou plaquettaire, ou « thrombus blanc ». Cette hémostase est imparfaite et temporaire. Son efficacité est maximale dans les vaisseaux de faible diamètre où le flux sanguin est faible.
- L'hémostase secondaire, ou coagulation sanguine : elle permet la consolidation du clou plaquettaire *via* la formation de fibrine. Cette étape fait intervenir des facteurs de coagulation pour transformer le thrombus blanc en thrombus rouge. Son efficacité est maximale dans les vaisseaux de petit et moyen calibre.
- La fibrinolyse : cette phase permet la dissolution du caillot par destruction du réseau de fibrine, grâce à des mécanisme de contrôle de l'hémostase (notamment des facteurs anticoagulants).



**Figure 1** : Schéma simplifié illustrant le déroulement de l'hémostase (Albistur A.)

Une hémostase efficace permet le juste équilibre entre la prévention des hémorragies et celle des thromboses, et donc de manière réciproque, entre la quantité de facteurs anti thrombiques et coagulants. Il y a donc une double fonction qui implique de nombreuses molécules en interaction. Cette partie permettra d'aborder plus en détail les différentes étapes de l'hémostase.

### **I.a.1. L'hémostase primaire**

La paroi vasculaire est composée de la lumière du vaisseau, d'une couche de cellules endothéliales, d'une membrane basale ainsi que de tissu conjonctifs sous-endothélial, riche en collagène de type III.

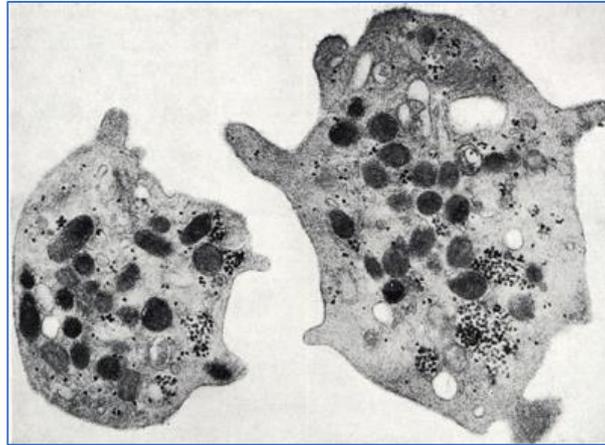
En l'absence de brèche vasculaire, cette paroi a essentiellement une propriété anti-thrombique (qui évite la formation d'un clou plaquettaire). En effet, elle constitue une barrière physique entre le sang et le tissu sous-endothélial. Elle sécrète de la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) inhibant l'activation plaquettaire, ainsi que du monoxyde d'azote (NO) inhibant l'agrégation plaquettaire tout en maintenant un tonus vasodilatateur (augmentation du flux sanguin et absence de dépôt). Ainsi, le clou plaquettaire ne se forme pas ; l'hémostase primaire est empêchée. La paroi vasculaire exprime également du sulfate d'héparane (forme complexe d'héparine) et de la thrombomoduline, qui ont toutes deux des propriétés anti-coagulantes, notamment *via* l'inhibition de la thrombine, molécule clé de l'hémostase secondaire. Enfin, la paroi vasculaire synthétise de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA pour tissue-Plasmin Activator), un acteur de la fibrinolyse favorisant la transformation de plasminogène en plasmine.

L'hémostase primaire se met en place lors de brèche vasculaire, donc s'il y a une perte de continuité de l'endothélium. Elle est divisée en deux temps : un temps vasculaire et un temps plaquettaire, eux-mêmes divisés en cinq étapes, faisant intervenir quatre acteurs : la paroi vasculaire, les plaquettes, le facteur de von Willebrand (Fvw) et le fibrinogène.

Les plaquettes (figure 2) sont des éléments cellulaires anucléés en forme de disque produits à partir des mégacaryocytes. Elles possèdent surtout une activité pro-coagulante. Leur membrane plasmique est composée d'une double couche de phospholipides. Des glycoprotéines membranaires sont aussi présentes : la GPIIb/IIIa (récepteur du fibrinogène) et la GPIb-IX-V, un récepteur du facteur de von Willebrand (Fvw). Enfin, les plaquettes possèdent des granules cytoplasmiques contenant beaucoup de substances pro-coagulantes (Ex : le fibrinogène), le Fvw, le facteur V (cofacteur de beaucoup de réactions enzymatiques de la cascade de coagulation) ou encore de l'ADP (Adénosine DiPhosphate exerçant une fonction d'agrégant plaquettaire) et du Ca<sup>2+</sup> (indispensable à la cascade de coagulation).

Synthétisé par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, le facteur de von Willebrand est un polymère glycoprotéique de poids moléculaire très variable. Il joue le rôle de cofacteur de l'adhésion plaquettaire en faisant le pont entre le collagène III et la GPIb-IX-V plaquettaire.

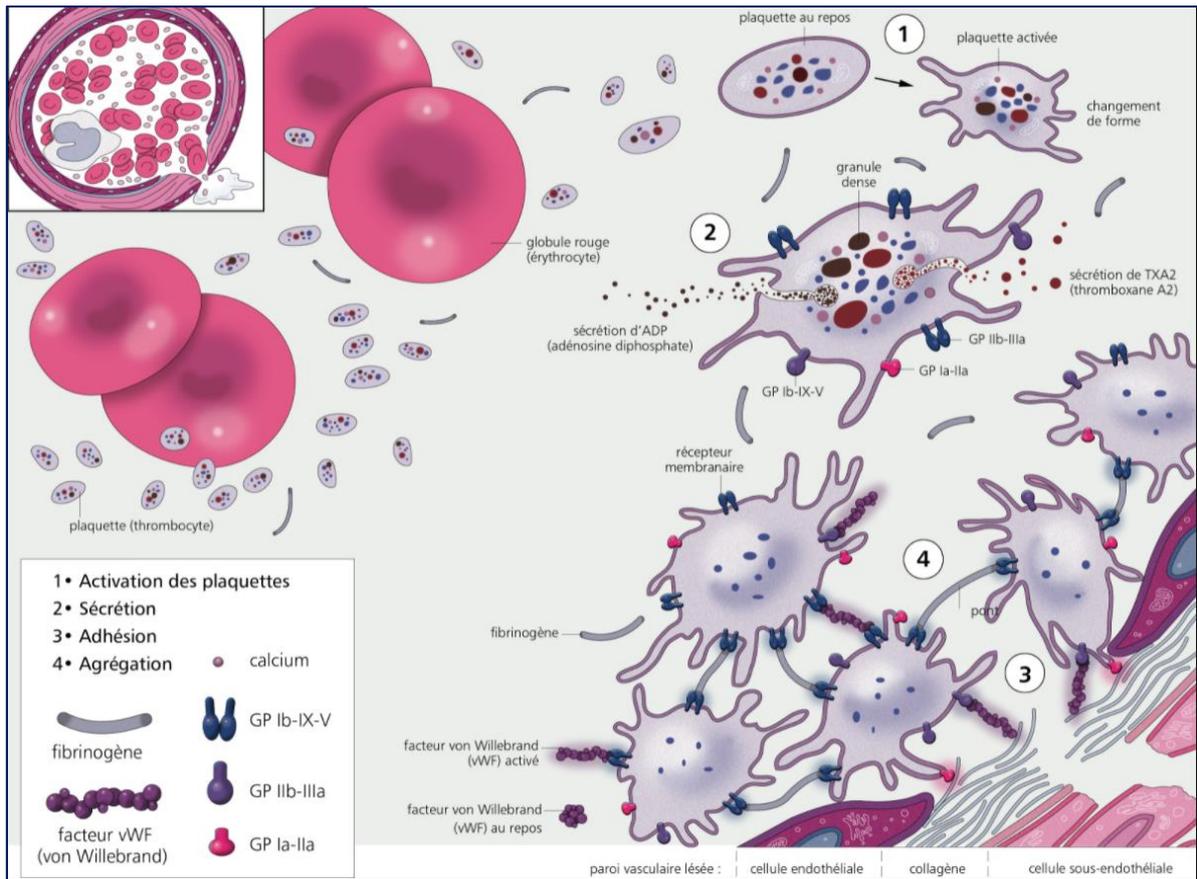
Le fibrinogène est un cofacteur essentiel à l'agrégation plaquettaire. Il est formé de trois sous-unités, une sous-unité E et deux sous-unités D qui, en se liant aux GpIIb/IIIa, font le pont entre les plaquettes stabilisant ainsi le clou plaquettaire en un caillot sanguin. Les sous-unités D sont des marqueurs de la fibrinolyse (D-dimères).



**Figure 2** : Plaquettes avec granules cytoplasmiques (MET x1000) (Faculté de médecine de Rennes)

Le temps vasculaire est donc mis en place suite à un dommage vasculaire (étape 1). Les terminaisons sympathiques présentes dans la paroi vasculaire sont alors stimulées ; ceci provoque une vasoconstriction du vaisseau lésé (étape 2). De façon simultanée, la lésion du vaisseau est à l'origine d'une exposition du sang aux tissus sous-endothéliaux contenant des substances pro-coagulantes (étape 3). Enfin, le collagène de type III sous endothélial hautement thrombogène est exposé à la surface et stimule la fixation des plaquettes. Ce temps, bien qu'il soit très rapide et éphémère (environ une minute) permet de limiter les fuites sanguines, mais aussi de favoriser l'agrégation plaquettaire au niveau de la brèche, ce qui diminue le diamètre du vaisseau jusqu'à 50% (figure 3) : l'efficacité de cette phase dépend de la taille et de la nature du vaisseau endommagé (étape 4). Ces mécanismes permettent alors la formation d'un clou plaquettaire, appelé aussi « thrombus blanc » (étape 5).

Les plaquettes, par leurs glycoprotéines GpIb-IX-V, se lient au collagène de type III de la matrice *via* le Fwv (figure 3 : adhésion). Cette adhésion provoque ensuite l'activation plaquettaire (figure 3 : activation). Les thrombocytes sécrètent de l'ADP (figure 3 : sécrétion), qui induit l'agrégation des plaquettes en se liant à ses récepteurs (figure 3 : agrégation). Les plaquettes se préparent à l'agrégation en changeant de forme (elles passent à un aspect dendritique avec la formation de nombreux pseudopodes). Elles réalisent également de nombreux mouvements de flip flop afin d'être plus accessibles. Enfin, les plaquettes s'agrègent et, par l'intermédiaire du fibrinogène lié à leur GpIIb/IIIa, se consolident en un clou plaquettaire.



**Figure 3 :** Illustration des mécanismes mis en jeu lors de l'hémostase primaire (Bezeaud, 2010)

Sur le lieu de la brèche, il y a adhésion puis activation et agrégation des plaquettes qui forment, dans une étape finale, le clou plaquettaire. Cette étape est permise par l'activation consécutive de plusieurs facteurs et glycoprotéines, ainsi que par la sécrétion d'énergie sous forme d'ADP par les thrombocytes.

Le clou plaquettaire issu de l'hémostase primaire est cependant instable. Il ne persiste que dans les vaisseaux de petits calibres et si le flux sanguin devient trop important, il est balayé dans la circulation. Ainsi, l'hémostase secondaire intervient pour stabiliser ce clou plaquettaire.

### **I.a.2. Hémostase secondaire**

L'hémostase secondaire ou coagulation qui fait suite à l'hémostase primaire, permet la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble, et donc aboutit à la formation du caillot sanguin consolidant le clou plaquettaire, permettant ainsi l'obturation solide du vaisseau lésé. Cette réaction nécessite l'intervention d'une vingtaine d'enzymes impliquées dans une série de réactions. La majorité de ces enzymes est synthétisée par le foie sous une forme inactive (zymogènes ou cofacteurs inactifs). Ils sont ensuite activés en cascade pour acquérir leur fonction protéolytique (Palta *et al.*, 2014). Leur nomenclature utilise des chiffres romains et la lettre « a » placée après le chiffre indique la forme active.

*Exemple : le facteur X est sous forme inactive et sa forme active est le facteur Xa.*

La liste des différents facteurs de coagulation est présentée dans le tableau 1.

Un certain nombre de molécules qui ne sont pas des enzymes actives interviennent aussi dans cette chaîne de réaction :

- Des cofacteurs accélèrent la vitesse d'activation des enzymes :
  - ❖ Le facteur VIII : il se lie au facteur IX, formant ainsi le complexe Tenase, qui transforme le facteur X en facteur Xa (également appelée facteur de Stuart).
  - ❖ Le facteur V : intervient avec le facteur X pour former « le complexe prothrombinase », qui permet la transformation de la prothrombine (facteur II) en trombine (facteur IIa).
  
- Le Ca<sup>2+</sup> est indispensable à la plupart des étapes de la coagulation sanguine.

Quatre de ces facteurs (II, VII, IX et X) sont dits « vitamine K dépendants ». En effet, leur maturation (c'est-à-dire que leur transformation en facteurs activés) dépend de la vitamine K.

Cette liste est aujourd'hui en expansion, car de nouveaux facteurs impliqués dans cette réaction en chaîne sont découverts et caractérisés au fur et à mesure des recherches. Parmi les plus récemment découverts : la prékallikréine et le HMWK (kininogène de haut poids moléculaire) (Geddings et Mackman, 2014).

Les travaux de Davie et Ratnoff ainsi que ceux de Macfarlane ont permis de découvrir et de caractériser la physiologie de la coagulation sanguine en 1964 (Macfarlane, 1964). Autrefois, cette chaîne était décrite comme une cascade composée d'une voie intrinsèque (mettant en jeu des facteurs déjà présents dans l'espace intravasculaire) et d'une voie extrinsèque (faisant intervenir des facteurs extérieurs à l'espace intravasculaire), se terminant toutes deux par une voie commune avec l'activation du facteur X (Bakeer, 2016).

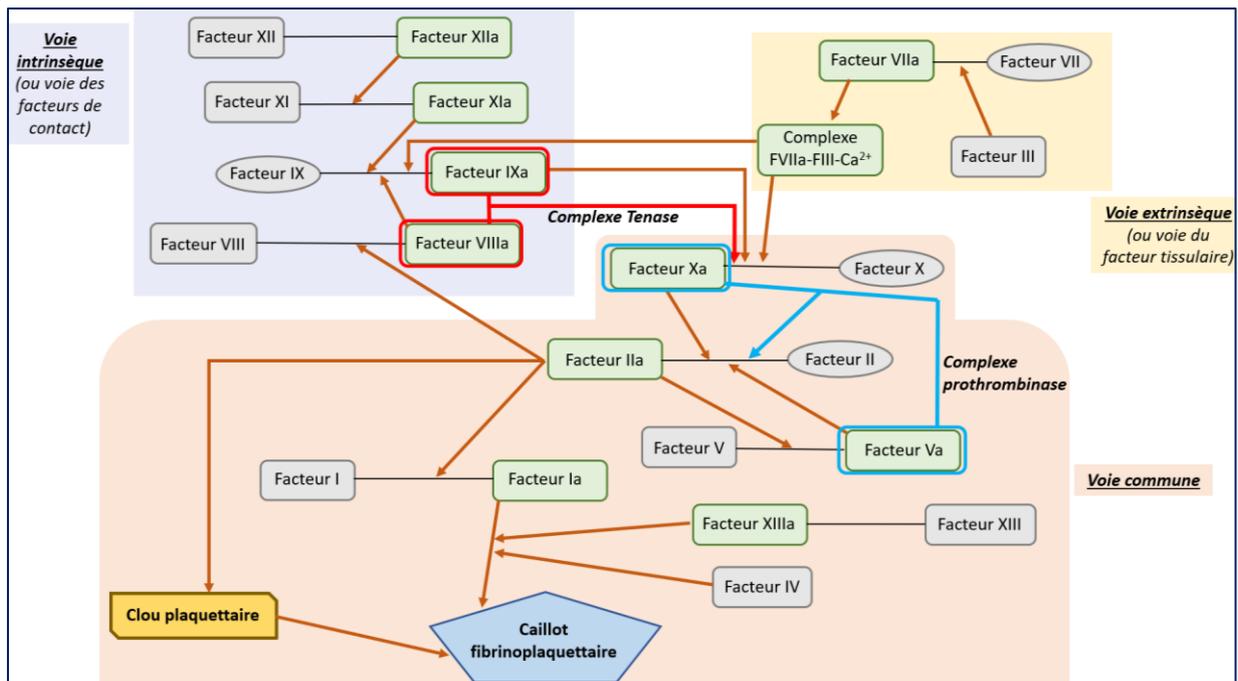
L'enchaînement des différentes étapes de la cascade est présentée sur la figure 4.

**Tableau 1** : Liste des différents facteurs de coagulation (d'après Palta et al, 2014)

Nomenclature internationale	Nom propre	Fonction dans la coagulation	C° plasm (mg/L)	Temps de demi-vie (heure)
I	Fibrinogène	Constituant majeur du thrombus	3000	90
II	Prothrombine	Activation des facteurs I, V, VII, VIII, XI, XIII, protéine C, plaquettes	100	65
III	Facteurs tissulaires (ou thromboplastine)	Cofacteur du facteur VIIa	/	/

IV	Calcium	Favorise la fixation des facteurs de coagulation aux phospholipides	/	/
V	Proaccélélerine	Cofacteur du facteur X	10	15
VI	<i>N'existe plus. Anciennement accélélerine</i>	<i>Correspondait au facteur Va</i>	/	/
VII	Proconvertine	Active les facteurs IX et X	0,5	5
VIII	Facteur antihémophilique A	Cofacteur du facteur IX	0,1	10
IX	Facteur antihémophilique B (ou facteur Christmas)	Active le facteur X en association avec le facteur VIII	5	25
X	Facteur Stuart-Prower	Active le facteur II et de complexe avec le facteur V	10	40
XI	Antécédent de la thromboplastine	Active le facteur IX	5	45
XII	Facteur Hageman	Active le facteur XI, VII et la prékallikréine	/	/
XIII	Facteur de la stabilisation de la fibrine	Formation du réseau de fibrine	30	200
XIV	Prékallikréine (ou facteur de Fletcher)	Protéase sérique	/	35
XV	HMWK ou facteur de Fitzgerald	Cofacteur	/	150
XVI	Facteur von Willebrand	Fixation au facteur VIII, modulation de l'agrégation plaquettaire	10	12
XVII	Antithrombine III	Inhibe les facteurs IIa, Xa et autres protéases	200	72
XVIII	Cofacteur II de l'héparine	Inhibe le facteur IIa	/	60
XIX	Protéine C	Inactive les facteurs Va et VIIIa	/	0,4
XX	Protéine S	Cofacteur de la protéine C activée	/	/

**Légende :** **En orange**, les facteurs de coagulation de la famille du fibrinogène ; **en bleu**, les facteurs de coagulation vitamine K-dépendants ; **en vert**, les facteurs de coagulation agissant par contact



**Légende :**

-  Activation d'un facteur de coagulation
-  Enzyme vitamine K-dépendante
-  Stimulation

**Figure 4 :** Voies d'activation de la cascade de coagulation, représentation historique (Albistur A.)

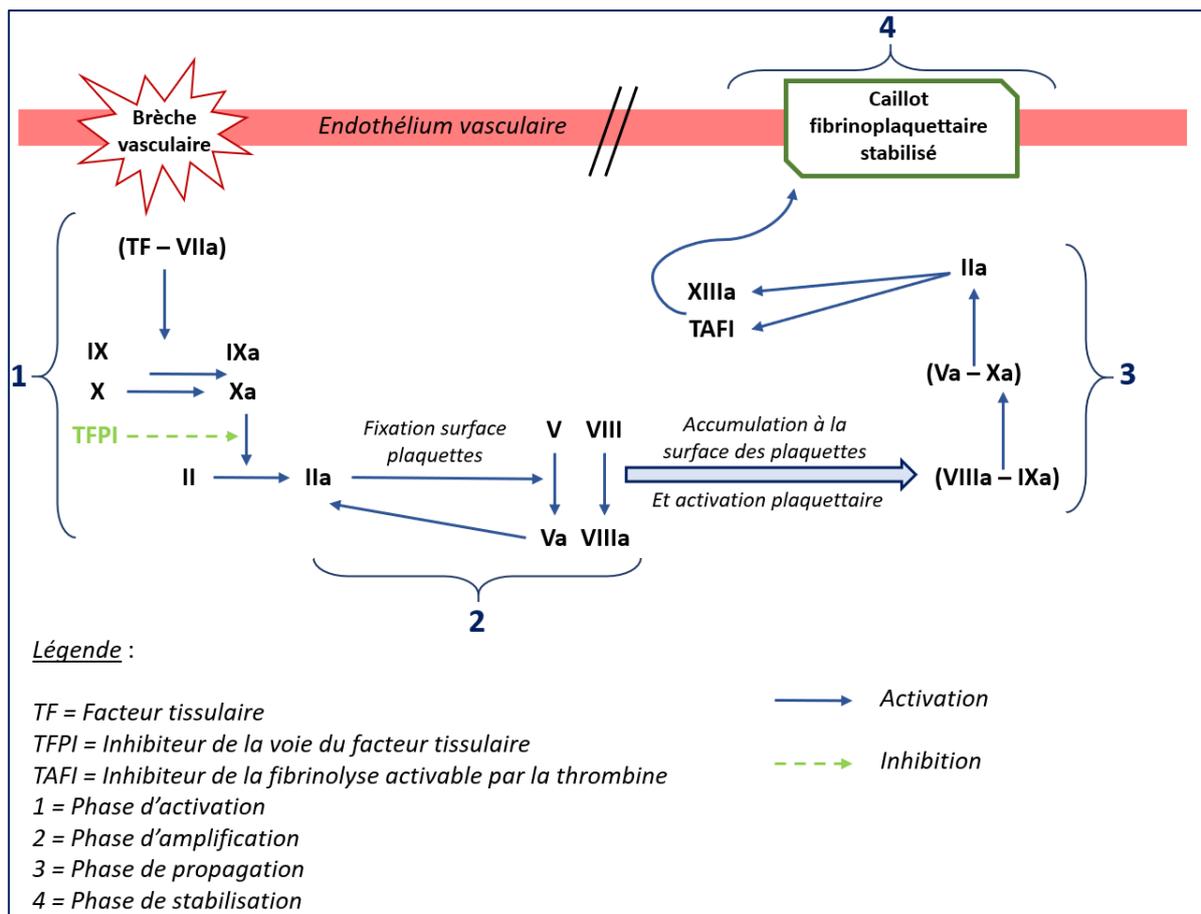
- **La voie intrinsèque :** aussi appelée « phase de contact » ; consiste en l'activation de facteurs de contact, c'est-à-dire la kinine de HPM (haut poids moléculaire), la prékalligréine mais surtout le **FXII**. Ce dernier s'active au contact de surfaces chargées négativement (membrane cytoplasmique des plaquettes activées qui contiennent des phospholipides). A partir de là, la cascade de coagulation s'enclenche. Successivement, les facteurs XI, IX et X s'activent.
- **La voie extrinsèque :** ici, l'activation est avant tout assurée par le FIII (facteur tissulaire III). C'est une glycoprotéine présente et synthétisée au niveau des tissus sous-endothéliaux. Lors d'un dommage à l'endothélium, le facteur III est libéré. Il forme un complexe avec le FVIIa et du Ca<sup>2+</sup> qui active le FIX de la voie intrinsèque et le FX de la voie commune, générant ainsi une petite quantité de thrombine.

- La voie commune : le facteur X précédemment formé est à l'origine de la voie commune. Elle génère l'essentiel de la thrombine, l'enzyme clé de la coagulation, à partir de la prothrombine (facteur II). La thrombine assure le dépôt de fibrine et active plusieurs autres facteurs de la coagulation : les FV, FVIII et FI qui exercent un rétrocontrôle positif sur les différents facteurs et notamment sur ceux de la voie intrinsèque, permettant une génération massive de thrombine. Cette enzyme est donc un puissant activateur plaquettaire.

L'amplification du phénomène est assurée par le complexe Tenase (constitué des facteurs IXa et VIIa) et par le complexe Prothrombinase (associant le facteur Xa, Va, du Ca<sup>2+</sup> et des phospholipides). C'est ce qu'on appelle le « Thrombine burst ». En effet, dès lors qu'un peu de facteur FX est formé, cela permet la formation d'un peu de thrombine qui amplifie par la suite toute la cascade d'activation. La voie commune aboutit alors à la formation de longs filaments de fibrinogène : la fibrine qui fixe et stabilise le clou plaquettaire.

Pour résumer, l'activation de l'hémostase se fait *via* la voie extrinsèque : le facteur tissulaire généré va entraîner la formation de facteur Xa qui, *via* la voie commune, va entraîner la formation d'une petite quantité de thrombine. Celle-ci va servir de bougie d'allumage à la voie intrinsèque car la thrombine est capable d'activer les Facteurs V, VIII et XI et donc de provoquer la formation d'une plus grosse quantité de thrombine. Cette thrombine va ensuite servir à transformer le fibrinogène en fibrine ce qui stabilise le caillot. Le facteur X est donc un pivot entre les deux voies permettant d'aboutir à la voie commune.

La représentation historique de la coagulation permet de comprendre les différents tests réalisés pour explorer la coagulation sanguine pendant l'exercice pratique (Exemple : temps de Quick) (Caen *et al.*, 1970). Cependant, cette représentation n'illustre pas le système de coagulation *in vivo*. En effet, les surfaces cellulaires occupent une place importante dans la cascade de coagulation *in vivo*, notamment lors de l'hémostase secondaire. D'après plusieurs auteurs (Samama, 2009 ; Palta *et al.*, 2014 ; Bakeer, 2016), cette cascade de coagulation peut se décrire comme l'enchaînement d'étapes successives : l'activation, l'amplification, la propagation et la stabilisation (Versteeg *et al.*, 2013). C'est le schéma de réaction présenté sur la figure 5 qui représenterait le mieux la coagulation *in vivo*.



**Figure 5 :** Représentation moderne de la coagulation sanguine en quatre phases (Albistur A.)

L'apparition d'une brèche sur un vaisseau entraîne un mécanisme d'activation de la coagulation. En plus d'une synthèse thrombocytaire, ce phénomène met en jeu plusieurs facteurs tissulaires, ce qui aboutit après stabilisation à la formation d'un caillot fibrinoplaquettaire et donc à la réparation de la brèche vasculaire. Les facteurs TFPI et TAFI permettent la régulation de ce phénomène.

### I.a.3. Les mécanismes de contrôle de la coagulation : inhibition physiologique

La coagulation est finalement un système dynamique qui bénéficie d'un système d'auto-amplification une fois que la cascade de coagulation a commencé. Mais, bien que ce système d'auto-amplification permette à la coagulation d'être mise en place rapidement et de manière efficace, cette mise en place doit se limiter aux réparations de brèches vasculaires, afin de ne pas engendrer d'état d'hypercoagulabilité. Ainsi, il existe un phénomène de contrôle de la coagulation qui limite à la brèche vasculaire l'effet de la thrombine décrit précédemment. Trois acteurs principaux sont impliqués : l'anti-thrombine (AT), les protéines C et S et le *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI).

Comme son nom l'indique, le TFPI inhibe la voie du facteur tissulaire ou voie extrinsèque. Il est synthétisé par les cellules endothéliales. Pour commencer, il inhibe la voie du facteur IX tissulaire en formant un complexe avec le facteur Xa, avant de s'associer au complexe TF-FVIIa. Ainsi se forme un complexe quaternaire FXa-TFPI-TF-FVIIa.

L'héparine (non fractionnée, et de bas poids moléculaire) permet de détacher le TFPI fixé aux glycosaminoglycanes de l'endothélium, ce qui permet d'augmenter encore son activité inhibitrice (Jobin, 1995).

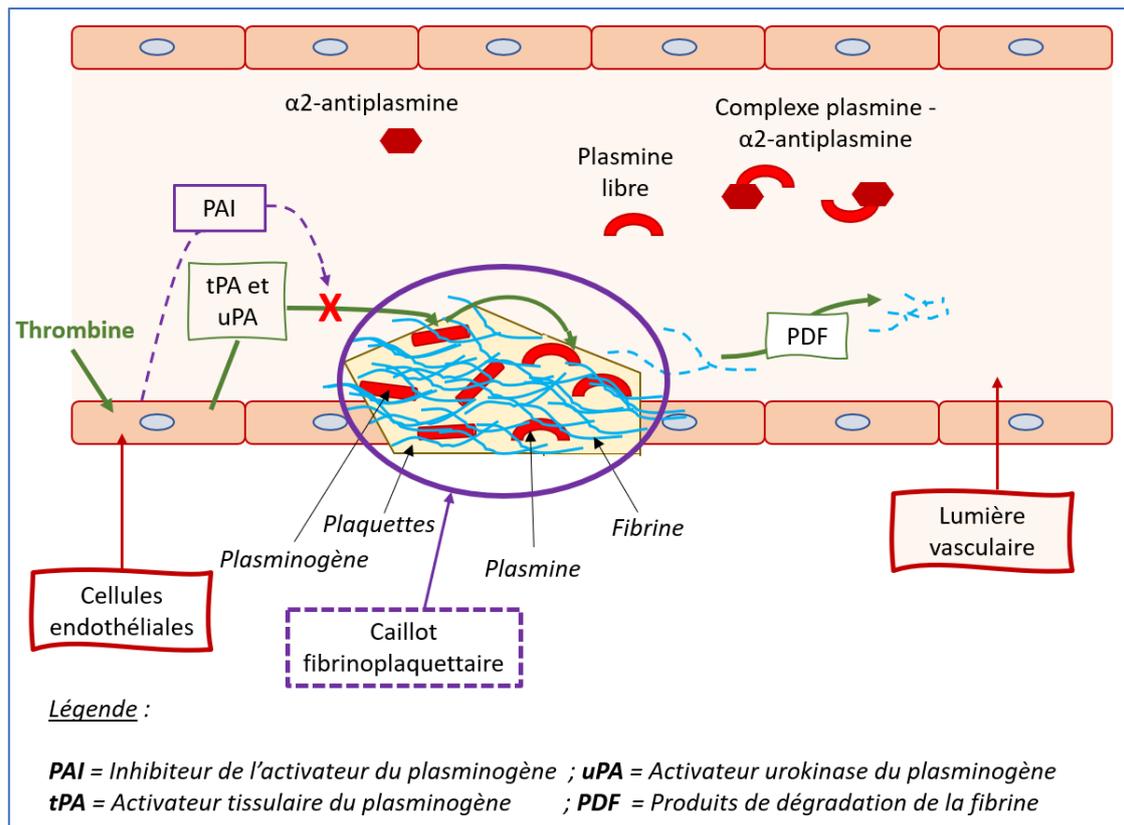
De plus, l'anti-thrombine, protéine synthétisée par le foie, fait partie des facteurs de contrôle de la coagulation. Elle est activée par l'héparine présente sur la surface endothéliale et inhibe la thrombine. Ainsi, l'activité inhibitrice du plasma est assurée à 80% par cette protéine, puisqu'elle inhibe les facteurs VIIa, IXa, Xa, XIa et IIa (Jobin, 1995 ; Samama, 2009).

Les protéines C et S sont elles aussi synthétisées par le foie. La protéine C est activée quand la thrombine est mise en présence de thrombomoduline, pour donner la PCa (protéine C activée). Grâce à la protéine S, son co-facteur, elle possède une activité inhibitrice sur les facteurs Va et VIIIa, en empêchant l'activation du facteur V. Ainsi, nous pouvons dire que la thrombine a une action coagulante lorsqu'une paroi vasculaire est endommagée, alors qu'elle a un rôle anti-coagulant lorsque la paroi vasculaire est intacte, puisqu'elle va alors favoriser la production de la PCa (qui est anticoagulante). Ainsi, la formation de thrombine et la transformation du fibrinogène sont limitées au site de la brèche vasculaire. Le caillot formé est rapidement éliminé par fibrinolyse afin d'éviter l'obstruction du vaisseau (Samama, 2009).

#### **I.a.4. Fibrinolyse**

L'étape ultime de l'hémostase est la fibrinolyse (figure 6). Elle débute très rapidement après la constitution du caillot et permet la destruction de la fibrine et du fibrinogène grâce au plasminogène. C'est une glycoprotéine circulante, qui est synthétisée par le foie. Une fois fixé sur la fibrine et hydrolysée par deux activateurs (Trzeciak et Denninger, 2003), elle se transforme en plasmine, qui est une enzyme protéolytique et fibrinolytique. Elle agit également sur le fibrinogène et sur les facteurs V et VIII. C'est cette enzyme qui permet de dégrader la fibrine en PDF (produits de dégradation de la fibrine) et fibrinogène (Samama, 2009).

Le plasminogène est activé par deux molécules : le *tissue-Plasminogen-Activator* (tPA ou activateur tissulaire du plasminogène) et l'urokinase-PA (u-PA), deux sérines protéases libérées par l'endothélium vasculaire (Palta *et al.*, 2014). La libération du t-PA est contrôlée par la thrombine, l'adrénaline et l'ADH (hormone anti-diurétique) et son activité est fibrino-dépendante. L'u-PA, quant à elle, nécessite une activation par la plasmine (Samama, 2009).



**Figure 6 :** Représentation schématique de la fibrinolyse (Albistur A.)

La fibrinolyse est la dernière étape de la coagulation. Le plasminogène est activé grâce à des facteurs tissulaires (tPA et uPA). Il permet ensuite la dégradation de la fibrine et du fibrinogène en PDF, et donc aboutit à la destruction du caillot fibrinoplaquettaire. L'enzyme PAI permet la régulation de ce phénomène.

Afin que le phénomène de fibrinolyse ne soit pas délétère pour l'organisme (défaut ou excès et dissémination du thrombus), il existe des inhibiteurs de la fibrinolyse. Les principaux sont les suivants (Palta *et al.*, 2014 ; Chapin et Hajjar, 2015) :

- L'α-2 antiplasmine et l'α-2 macroglobuline : ce sont des inhibiteurs spécifiques de la plasmine, puisqu'ils inhibent la dégradation de la fibrine par la plasmine, en formant un complexe plasmine-α2-antiplasmine. En effet, les plasmines, après avoir agi, se retrouvent libres dans la circulation et sont donc neutralisées.
- Les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI) de type 1 et 2 : ils régulent la fibrinolyse en empêchant la conversion de plasminogène en plasmine par les tPA et uPA.
- Le TAFI (Inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine) : il diminue l'affinité du plasminogène pour la fibrine après avoir été activé par le complexe thrombine-thrombomoduline.

## **I.b. La vitamine K**

Le groupe « vitamine K » est un groupe de vitamines dites liposolubles, qui interviennent essentiellement dans la coagulation sanguine, ainsi que dans le métabolisme des os et d'autres tissus, en entraînant des modifications post-traductionnelles de protéines intervenant dans le cycle présenté précédemment.

### **I.b.1. Découverte de la vitamine K**

Les vitamines K ont été découvertes par un biochimiste danois, Carl Peter Henrik Dam, dans les années 1930. Alors qu'il étudiait le métabolisme du cholestérol chez les poules recevant une alimentation pauvre en lipides et en stérols (mais complémentée en vitamines A et D) pendant plusieurs semaines, il constatait que ces animaux étaient capables de synthétiser leur propre cholestérol. Cependant, ces mêmes animaux souffraient d'hémorragie persistantes, malgré l'ajout de cholestérol dans leur alimentation. Il sembla alors clair qu'en plus du cholestérol, une autre substance à effet coagulant a été retirée des aliments. Pour continuer ses recherches sur le métabolisme du cholestérol, il se rapprocha alors de deux biochimistes allemands, Rudolph Schoenheimer et Adolf Windaus, lauréats du prix Nobel de Chimie en 1928, pour la découverte de la vitamine D.

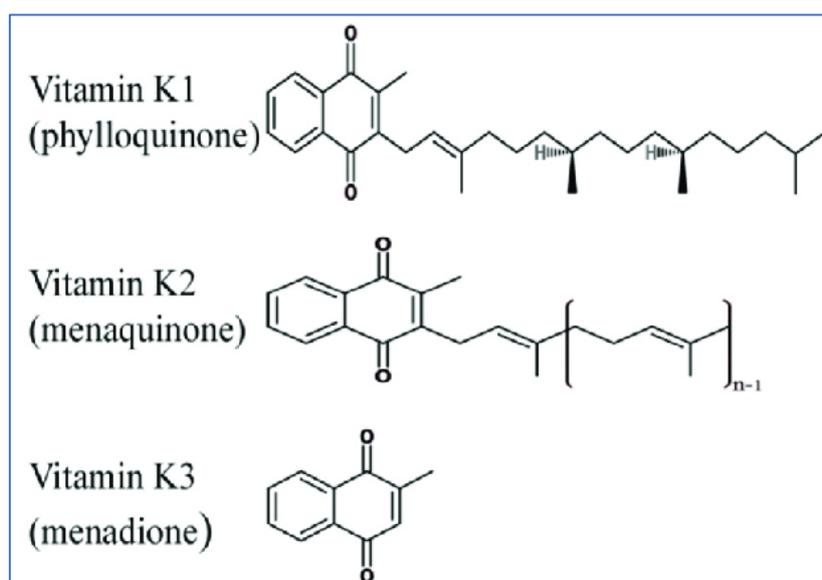
Jusqu'en 1934, Dam poursuivit ses recherches sur ces hémorragies avec Schönheyder (Zetterström, 2006). Leur but était de déterminer la cause des saignements persistants observés lors de l'étude précédente. Ils démontrèrent que ceux-ci étaient dus à une déficience d'un facteur antihémorragique, sans pour autant réussir à l'identifier précisément. C'est en 1935 qu'ils réussirent à prouver que le facteur incriminé était une vitamine liposoluble, différente des vitamines A, D et E. Elle se retrouve dans certaines céréales, graines, feuilles, ou foies d'animaux. Ce composé a été appelé « vitamine de coagulation », et reçut la lettre K, en rapport avec le mot allemand et scandinave « *koagulation* » (Dam, 1935). En 1936, il réussit à isoler la vitamine K à partir de feuilles de luzerne, et entreprit des recherches pour déterminer son implication dans la coagulation.

En parallèle de ces recherches, un composé vitaminique fut extrait à partir de feuilles de luzerne et de chair de poisson par les deux chercheurs Almquist et Stokstad. A partir de cette étude, le biochimiste américain Edward Doisy a réussi à montrer qu'il existait deux formes chimiques de la vitamine K : la vitamine K1 isolée à partir des feuilles de luzerne, et la vitamine K2 à partir de la chair de poisson (Zetterström, 2006). Ainsi, en 1943, Dam et Doisy reçurent respectivement le prix Nobel de Physiologie et de Médecine, pour leurs travaux sur la vitamine K.

### I.b.2. Structure et sources de la vitamine K

Aujourd'hui, nous savons que plusieurs vitamines sont en fait regroupées sous le terme général de vitamine K. En effet, les molécules appartenant à ce groupe ont en commun leur noyau ménadione, auquel est accroché une chaîne latérale de résidus isopropène. Toutes les vitamines K se différencient en fonction de la longueur et du degré de saturation de la chaîne (Hill et Morrisey, 2011). A ce jour, trois formes de vitamine K sont connues (figure 7) (Combs et McClung, 2017) :

- Les vitamines K1 (2-méthyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone), appelées aussi phylloquinones (K) : elles sont principalement retrouvées dans les végétaux verts, mais peuvent également être synthétisées par les bactéries photosynthétiques. Ce sont les formes les plus classiques qui sont utilisées pour le traitement symptomatique des hémorragies. Leur chaîne latérale est composée de plusieurs isopropènes saturés. Elle sont notées « K-n », où « n » représente le nombre de résidus.
- Les vitamines K2 (2-méthyl-3-multiprényl-1,4-naphtoquinone), ou ménaquinones (MK) : elles sont synthétisées par certaines bactéries de la flore intestinale. Ces vitamines sont très complexes, et leurs rôles ne sont pas encore tout à fait définis. Leur chaîne latérale est complètement ou partiellement insaturée, et la longueur des résidus isopropènes peut varier. De la même manière que les vitamines K1, elles sont notées « MK-n ».
- Les vitamines K3 (2-méthyl-1,4-naphtoquinone), ou ménadiones : ce noyau est retrouvé dans toutes les molécules du groupe de vitamine K. Il n'existe pas à l'état naturel, et est uniquement synthétisé artificiellement. Elles seraient intéressantes uniquement chez les ruminants, où les bactéries vont les transformer en vitamines K1 par ajout de la chaîne latérale. On en rajoute parfois dans l'alimentation animale où elles jouent le rôle de précurseur des autres vitamines (Combs et McClung, 2017).



**Figure 7** : Structure chimique des différentes formes de la vitamine K (Lennarz et al, 2013)

### I.b.2.i. Les sources alimentaires de vitamine K

A ce jour, il n'existe que très peu de données concernant l'apport alimentaire en vitamine K chez les animaux. Les seules données qui sont répertoriées concernent les sources alimentaires chez l'Homme.

On va retrouver essentiellement les vitamines K1 dans les légumes verts, notamment dans les brocolis, choux de Bruxelles, épinards, laitue et tomate. On en retrouve aussi un peu dans le lait, la viande, le thé vert, les œufs, le beurre, huiles végétales (maïs et tournesol) et les céréales (Combs et McClung, 2017). Ainsi, le principal apport (90%) de vitamine K est sous forme de vitamine K1 (les phylloquinones). La vitamine K2, quant à elle, est principalement retrouvée dans les produits d'origine animale (comme la viande et le foie) et dans les produits fermentés (fromages, natto [aliment japonais à base de soja]) (Bal et Drouet, 2009).

### I.b.2.ii. Les sources non alimentaires de vitamine K

Comme nous l'avons vu précédemment, les bactéries commensales de la flore digestive sont capables de biosynthétiser de la vitamine K sous forme de MK. Cependant, il a été montré que les apports en vitamine K par ce biais ne seraient que très faibles (Barkhan et Shearer, 1977 ; Bal et Drouet, 2009). Les bactéries peuvent être de type anaérobie (comme par exemple *Bacteroides spp*) ou anaérobie facultatif (comme par exemple *Escherichia coli*). Elles sont retrouvées en majorité au niveau du colon, et synthétisent des MK à longue chaîne (MK-6 à MK-12) (Combs et McClung, 2017).

## **I.b.3. Le métabolisme de la vitamine K**

### I.b.3.i. L'absorption de la vitamine K

Le système lymphatique est impliqué directement dans l'absorption intestinale des vitamines K alimentaires chez les mammifères (Shearer *et al.*, 2012 ; Combs et McClung, 2017). Même si leur modalités d'absorption se ressemblent, il existe des spécificités en fonction du type de vitamine K (Shearer et Newman, 2008). Dans tous les cas, les vitamines K doivent être intégrées dans des micelles lipidiques avant d'être captées par les entérocytes en raison de leur caractère liposoluble. Cette intégration est facilitée par la présence des sels biliaires et des sucs pancréatiques.

- L'absorption de la vitamine K1 est permise par un transporteur actif du cholestérol appelé NPC1L1 (qui signifie « *Niemann-Pick C1-like 1* ») en association avec des récepteurs de « tri » intestinaux (Exemples : SR-BI et CD36) (Said, 2018). Cette absorption se fait majoritairement dans la partie proximale de l'intestin grêle.
- En revanche, l'absorption de la vitamine K2 se fait grâce à un système passif. C'est la présence de sels biliaires, d'acides gras saturés et en fonction du pH intraluminal

qu'elle est permise. Ce phénomène se produit au niveau du colon et de la partie terminale de l'intestin grêle.

Pour pouvoir être exportées dans le système lymphatique (ou directement dans le plasma), les vitamines K doivent être prises en charge par les chylomicrons ayant acquis les protéines apoA et apoB48 (Engelking, 2015). Cependant, l'absorption des vitamines K est variable car leur liposolubilité dépend de la longueur de leur chaîne latérale. Ainsi, les vitamines K utilisées pour les traitement d'hémorragies persistantes sont complétées par un excipient huileux, ce qui permet une absorption à 80% par l'organisme, contre 5 à 15% pour les phylloquinone naturelles. En revanche, les MK d'origine alimentaire pourraient être absorbées à 100% (Bal et Drouet, 2009). Enfin, la vitamine K3 étant hydrophile, son absorption se fait directement au niveau des entérocytes, sans l'intervention des sels biliaires et micelles, et passe par le système porte du foie (Engelking, 2015).

#### I.b.3.ii. La distribution de la vitamine K

Nous avons vu précédemment que la majorité des vitamines K nécessitent l'intervention des chylomicrons pour pouvoir passer dans la circulation. Ceux-ci passent par le foie où ils sont transformés en lipoprotéines, avant de rejoindre la circulation générale à nouveau. Ces lipoprotéines sont ensuite stockées ou utilisées par certains organes cibles, dotés de récepteurs à l'apoE (os, cœur, pancréas, tissus adipeux). Cependant, cela nécessite l'intervention de transporteurs : 50% des lipoprotéines sont transportées par des VLDL (*very low density lipoprotein*), 25% par des LDL (*low density lipoprotein*), et 25% par des HDL (*high density lipoprotein*) (Hill et Morrissey, 2011 ; Shearer *et al.*, 2012). Ce sont les phylloquinones qui représentent la majorité des vitamines K circulantes (Bal et Drouet, 2009).

Cependant, les réserves de vitamines K dans l'organisme sont faibles (de l'ordre de 1,5µg/kg), et le foie est le premier organes de stockage de la vitamine K (Shearer et Newman, 2008). Ainsi, en complément de l'apport alimentaire constant en vitamine K et de son excrétion, il existe un phénomène de renouvellement de cette molécule. De plus, des études ont montré que le type de vitamine K stocké diffère entre les organes et entre les espèces. En effet, chez l'Homme, 90% de la vitamine K hépatique est sous la forme de vitamine K2 contre 10% de vitamine K1, alors que la tendance s'inverse dans le cœur ou les os. Chez le cheval, la vitamine K stockée dans le foie est en majorité de la phylloquinone, alors que chez le chien, le foie héberge 50% de vitamine K1 et 50% de vitamine K2 (Engelking, 2015).

Nous avons vu que les organismes animaux reçoivent de la vitamine K sous différentes formes, avec une grande majorité de phylloquinone. Cependant, il a été montré que ce sont les MK qui alimentent en majorité les organes des animaux, et notamment les MK-4. Cette différence est permise grâce à une réaction enzymatique de désalkylation ; elle transforme les phylloquinones (notamment K-3) en ménaquinones (notamment MK-4), grâce à une enzyme proche de la UbiA-prényltransférase bactérienne (UBIAD1).

Dans cette réaction, la chaîne latérale de la phylloquinone est retirée pour produire de la ménadione, puis ré-alkylée pour produire de la MK-4 (Engelking, 2015). Au final, toutes ces réactions parallèles rendent les calculs d'entrées et de sorties de vitamine K difficiles.

### **I.b.3.iii. L'élimination des vitamines K**

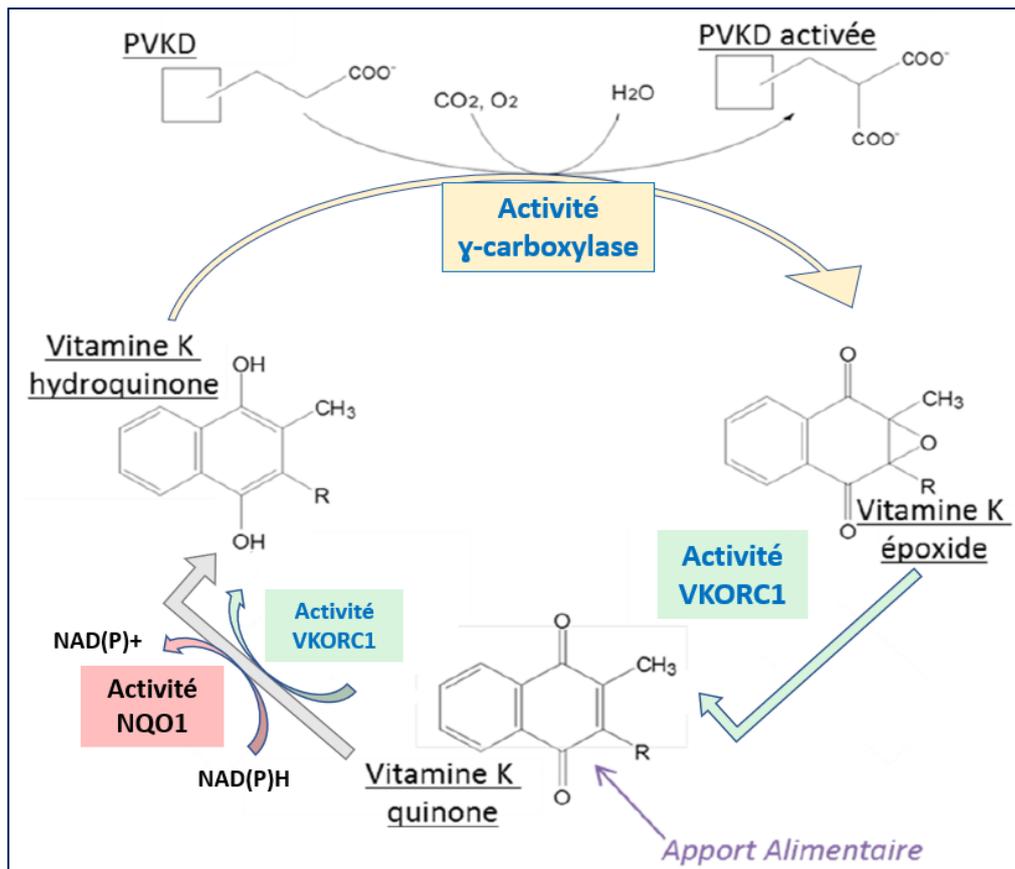
A ce jour, le catabolisme de la vitamine K est très peu connu (Shearer *et al.*, 2012), même si celui des phylloquinones est mieux connu que celui des ménadiones.

Certaines études ont montré que le catabolisme de la chaîne latérale de la vitamine K1 serait équivalent à celui de la vitamine E : d'abord une  $\omega$ -hydroxylation puis un raccourcissement progressif de la chaîne latérale par  $\beta$ -oxydations successives. Ces réactions se déroulant dans le foie (Shearer *et al.*, 2012), elles entraînent la production d'acide carboxylique à 5 ou 7 carbones, et autres dérivés. L'élimination de ces déchets est urinaire (20%) ou fécale (80%). Les réserves de phylloquinone sont cependant fragiles. En effet, les auteurs parlent d'une excrétion totale en à peine trois jours (Bal et Drouet, 2009), et d'un renouvellement des réserves en un jour et demi (Engelking, 2015).

Le catabolisme des MK, quant à lui, est moins bien connu, mais il suivrait le même schéma que celui des phylloquinones. En revanche, nous savons que la vitamine K3 est rapidement métabolisée et que les déchets de cette réaction sont excrétés dans les urines sous forme de phosphate, sulfate ou glucuronide de ménadiol (Engelking, 2015).

### **I.b.4. Cycle de la vitamine K et rôle dans l'organisme**

Les travaux de l'équipe de Lennarz et ses collaborateurs ont montré que les apports en vitamine K et les réserves présentent dans les organismes animaux ne suffisent pas à eux-seuls à couvrir les besoins journaliers des animaux. Cependant, nous savons qu'il n'y a que très peu de carences en vitamine K mises en évidence chez les mammifères. Ces carences sont davantage retrouvées chez les espèces ayant un tube digestif court comme les volailles, ou chez les individus dont une flore intestinale est pauvre (comme les nouveau-nés, ou les adultes traités avec des antibiotiques). Cela prouve qu'il existe un phénomène de renouvellement de la vitamine K, appelé « cycle de la vitamine K (époxyde) » (Lennarz *et al.*, 2013). Toutes les vitamines K subissent le même cycle de recyclage (figure 8), car il intervient sur leur noyau commun de ménadione.



**Figure 8 :** Le cycle de la vitamine K (Hammed, 2014)

Le cycle de la vitamine K se découpe en trois étapes clés :

- L'oxydation de la vitamine K hydroquinone en vitamine K époxyde : cette étape est permise par l'activité de l'enzyme γ-carboxylase. Cette enzyme permet la carboxylation de Protéine Vitamine K Dépendante (PVKD) en résidus PVKD activés en présence de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub> (Tie et Stafford, 2017). La forme oxydée de vitamine K ne peut pas être catalysée par l'enzyme γ-carboxylase : elle doit alors être recyclée à son tour pour pouvoir être réutilisée en tant que co-facteur.
- La réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone : cette étape nécessite l'intervention d'une enzyme appelée « Vitamine K Epoxyde Réductase sous-unité 1 », ou VKORC1. Beaucoup de recherche ont été réalisées « *in vitro* » pour comprendre l'activité de cette enzyme, et nous savons aujourd'hui qu'elle agit comme co-facteur d'un composé sulfhydryle. Cependant, ce composé n'a jamais été identifié « *in vivo* » (Lennarz *et al.*, 2013).
- La réduction de la vitamine K quinone en vitamine K hydroquinone : la régénération de la vitamine K hydroquinone est assurée d'une part par l'enzyme VKORC1, mais aussi par une autre enzyme appelée « Déshydrogénase Quinone 1 » ou NQO1. Cette dernière agit en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAD(P)H) (Combs et McClung, 2017 ; Lennarz *et al.*, 2013).

A ce jour, il n’y a pas de réel consensus des chercheurs quant aux étapes du cycle, et il existe plusieurs représentations de ce même cycle. Par exemple, les études de Vermeer et de Lorient et Beaune s’accordent sur le fait que la vitamine K réductase serait une enzyme intervenant dans la 3<sup>e</sup> étape du cycle (Vermeer, 1990 ; Lorient et Beaune, 2006). Cependant, ils s’accordent sur le fait que tous les enzymes de ce cycle sont des protéines produites principalement dans les microsomes hépatiques, ce qui est cohérent avec la nature lipophile de la vitamine K.

#### I.b.4.i. Le rôle biologique des protéines vitamine K – dépendantes (PVKD)

Quand elles sont sous leur forme inactive (présente en début de cycle), les PVKD sont des protéines qui possèdent des résidus glutamates, notés « Glu ». Nous avons vu que la vitamine K est un cofacteur essentiel de l’enzyme  $\gamma$ -carboxylase : cette enzyme permet l’activation des PVKD, et plus précisément des résidus « Glu » en résidus « Gla ». Ces derniers sont dotés de deux charges négatives qui fixent les ions Calcium ( $Ca^{2+}$ ). Les PVKD exercent ensuite leur activité biologique une fois que le complexe ionique est fixé aux phospholipides membranaires. Par exemple, les facteurs de coagulation vitamine K dépendants peuvent se fixer aux plaquettes ou aux cellules endothéliales si, et seulement si, le complexe ionique est formé. Elles peuvent à ce moment-là exercer leur rôle dans l’hémostase (Hill et Morrissey, 2011).

Finalement, en plus de son rôle primordial dans la coagulation, la vitamine K serait tout aussi importante dans l’activation d’autres PVKD présentes dans de nombreux tissus différents, et qui ont des propriétés biologiques variées. Toutes ces propriétés ne sont pas connues à ce jour, mais une liste de plusieurs PVKD associées à leurs rôles et localisation sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 2** : Liste non exhaustives des PVKD, associées à leur localisation et leur rôle dans l’organisme (d’après Shearer, 1990 ; Hill et Morrissey, 2011 ; Combs et McClung, 2017)

Nom de la PVKD	Localisation dans l’organisme	Rôle biologique
<b>Facteur II</b>	Foie, puis plasma	Coagulation
<b>Facteur VII</b>		
<b>Facteur XI</b>		
<b>Facteur X</b>		
<b>Protéine C</b>		Anticoagulation
<b>Protéine S</b>		Cofacteur de l’anticoagulation
<b>Protéine Z</b>		Pas totalement connue (transporteur d’un inhibiteur de la coagulation)
<b>Ostéocalcine (Bone Gla protein)</b>	Os et plasma	Régulation de la calcification

<b>Matrix Gla Protein</b>	Os, cartilage, paroi vasculaire, tissus mous	Inconnue
<b>Protéine S</b>	Os	Intervention dans la formation extracellulaire de l'os
<b>Périostine</b>	Os	Inhibition la formation de cristaux d'oxalate de calcium en régulant l'excrétion rénale
<b>Néphrocalcine (<i>Kidney Gal protein</i>)</b>	Rein	Formation du réseau de fibrine
<b>Athérocalcine (<i>Kidney Gal protein</i>)</b>	Artères calcifiées	Calcification des artères
<b>Growth arrest specific gene 6 (<i>Gas6</i>)</b>	Cartilage, plusieurs tissus mous	Protecteur cellulaire de l'apoptose et régulation de la croissance cellulaire
<b>Protein-rich Gla Protein 1, 2, 3, 4 (<i>PRGP 1-4</i>)</b>	Tissus mous	Transduction de signaux cellulaires
<b>Transthyréline</b>	Encéphale	Implication dans le système nerveux
<b>Gla-rich protein (GRP) ou Ucma (<i>unique cartilage-matrix-associated protein</i>)</b>	Cartilage, peau, os, paroi vasculaire	Encore mal connue
<b>Venins serpent</b>	Appareil veineux	Coagulation du sang de la proie

Légende : **En orange**, PVKD ayant un rôle dans la coagulation ; **en blanc**, PVKD ayant un rôle anticoagulant ; **en bleu**, PVKD ayant une implication autre que dans la coagulation ; **en vert**, PVKD dont le rôle est encore inconnu

#### I.b.4.ii. Implication de la vitamine K dans la santé animale

Les études qui mesurent les besoins journaliers en vitamine K sont beaucoup plus développées chez l'Homme que chez les animaux. Ces études montrent que les besoins diffèrent selon l'âge, le sexe, et même les origines ethniques. Cependant, il en ressort une recommandation moyenne de 100µg/j d'apport de vitamine K, ce qui est largement couvert par les apports d'un régime alimentaire moyen (Hill et Morrissey, 2011).

Chez les animaux, les principaux cas rapportant un déficit en vitamine K dans l'organisme ont été observés lorsqu'un contexte pathologiques était déjà présent. En effet, ces patients souffraient d'insuffisance hépatique ou cholestase (Engelking, 2015), ou encore de syndrome de malabsorption intestinale (Edwards et Russel, 1987). Plus rarement, il a existé des carences en vitamine K rapportées chez des ruminants intoxiqués au trèfle doux (qui contient un anticoagulant appelé « dicoumarol »), ou chez des animaux nourris de manière inadaptée (Strieker *et al.*, 1996). Chez l'homme, les nouveau-nés sont les plus concernés par les carences en vitamine K. En effet, il n'y a pas de transmission transplacentaire de cette molécule, la flore intestinale n'est pas encore compétente pour en synthétiser *de novo*, la production hépatique des facteurs de coagulation n'est pas encore totale, et le lait maternel est très pauvre en vitamine K (Armengaud, 1998).

Ce déficit rend les nourrissons particulièrement sensibles aux hémorragies. Des protocoles de complémentation alimentaires ont été développés et adoptés par de nombreux pays (Combs et McClung, 2017). Pour terminer, certaines carences en vitamine K sont expliquées par des causes iatrogènes, notamment provoquées par une antibiothérapie touchant la flore intestinale, ou par un traitement à base d'anti-coagulants anti-vitamine K (volontaire ou accidentelle).

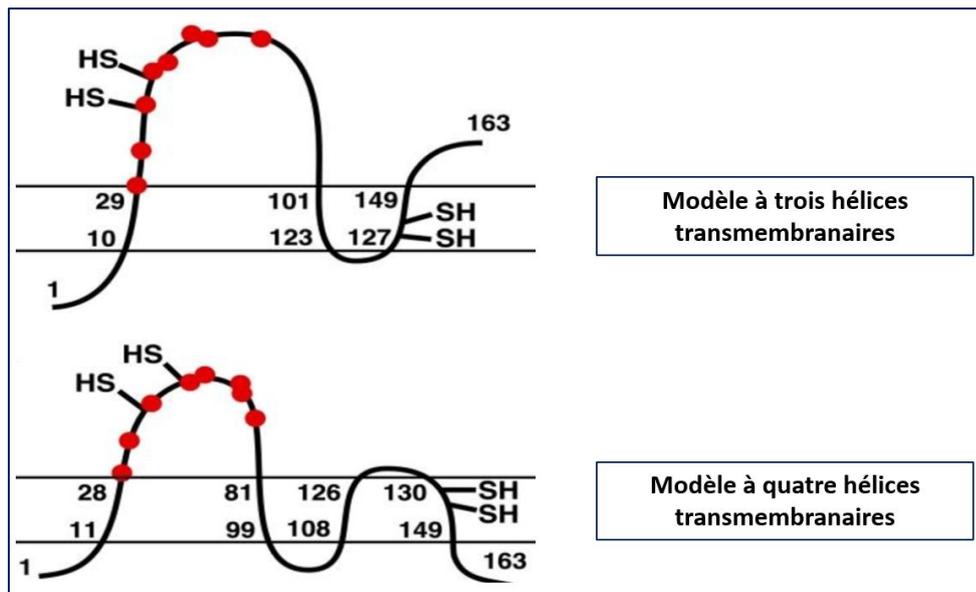
En revanche, les cas « d'excès de vitamine K » sont très rares et aucun seuil de toxicité n'a été démontré. Les seuls cas rapportés concernent des complémentations excessives accompagnées d'anémie hémolytique, de troubles gastro-intestinaux, d'insuffisance rénale ou d'atteinte hépatique (Combs et McClung, 2017 ; Hills et Morrissey, 2011).

Finalement, les cas rapportant des déficits ou des excès en vitamine K ne sont pas nombreux, et ont été davantage rapportés chez l'Homme que chez les animaux. Nous savons cependant que les carences en vitamine K ont un impact sur la coagulation et engendrent des troubles de l'hémostase. Mais nous savons aussi qu'elles affectent plusieurs protéines impliquées dans différents systèmes (tableau 2), nous pouvons donc supposer que ces carences entraîneraient aussi des troubles cardiovasculaires, arthrosiques, inflammatoires, neurologiques, des troubles dans la régulation de cancers (Combs et McClung, 2017) ou dans la régulation du diabète (Oldenburg *et al.*, 2008). Les vitamines K occupent une place prépondérante en santé humaine, et certainement en santé animale.

#### **I.b.5. VKORC1 : une enzyme importante intervenant dans le cycle de la vitamine K**

C'est une protéine qui doit sa découverte à Matschiner et son équipe, qui ont mené leurs travaux en 1970 ; il aura fallu attendre 2004 pour que le gène codant soit découvert, qu'elle soit nommée VKORC1 pour « *vitamin K epoxyde reductase complex subunit 1* », et que des études illustrent sa structure et son fonctionnement enzymatique (Wallin *et al.*, 2008). Ces études ont permis de montrer que c'est une protéine sensible à la warfarine.

Cette molécule est une petite protéine composée d'une séquence de 163 acides aminés, et ayant un poids moléculaire de 18 kDa (Garcia et Reistma, 2008). C'est une protéine qui est présente chez tous les vertébrés, et plusieurs acides aminés des séquences sont conservés quel que soit l'espèce (quatre cystéines en position 41, 43, 132 et 135, une sérine ou une thréonine en position 57) (Oldenburg *et al.*, 2008). La structure exacte de la protéine n'est pas exactement connue car c'est une molécule très difficile à isoler, mais nous savons qu'elle est intégrée dans la membrane du réticulum cytoplasmique des cellules (figure 9), et notamment des hépatocytes. Des études sur sa structure ont été entamées en se basant sur le profil d'hydropathie issu des indices des différents acides aminés. Ainsi, la protéine VKORC1 est représentée de deux façons différentes dans la littérature : un modèle avec trois hélices transmembranaires (Oldenburg *et al.*, 2007) et un modèle avec quatre hélices transmembranaires (Cao *et al.*, 2016 ; Oldenburg *et al.*, 2015 ; Müller *et al.*, 2014). Le modèle le plus communément utilisé dans les publications est le modèle à quatre hélices.



**Figure 9** : Représentations schématiques de la protéine VKORC1 selon les deux modèles prédictifs (Hammed, 2014)

Même si la protéine VKOR et son implication dans le cycle de vitamine K ont été établis depuis 1974 (Pelz *et al.*, 2005 ; Hodroge, 2011), ce n'est qu'en 2004 que deux équipes de recherches ont pu identifier et caractériser le gène impliqué. Ils appellent ce gène et sa protéine sensible aux AVK « VKORC1 », ou VKOR sous-unité 1 pour « *vitamin K epoxide reductase complex subunit 1* », dans l'hypothèse où la protéine appartiendrait à un groupe de protéine ayant une activité VKOR (Rost *et al.*, 2004 ; Garcia et Reitsma, 2008).

La protéine VKORC1 possède un site catalytique formé par les deux cystéines en positions 132 et 135. Une mutation de la séquence d'ADN entraînant une modification d'un de ces deux acides aminés fait perdre son activité de réduction de la KOX à la protéine (Garcia et Reistma, 2008). De par la conformation de son site d'oxydoréduction, cette protéine appartient à la famille des thiorédoxines : le site catalytique se présente comme un motif « Cys-X-X-Cys », c'est-à-dire composé de deux cystéines entourant deux acides aminés quelconques. Lors de la deuxième étape du cycle de la vitamine K (réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone), la protéine perd sa fonction catalytique car un pont disulfure est formé entre les deux cystéines.

Ce pont est à son tour réduit lors de la dernière étape du cycle pour que la protéine retrouve son pouvoir catalytique. Les études menées sur le cycle de la vitamine K et sur la protéine VKORC1 ont montré que ces étapes et ces transformations nécessitent l'intervention de « partenaires protéiques » physiologiques, sans que l'on ait réussi à les identifier précisément. Cependant, trois molécules sont étudiées *in vivo* : la PDI (*Protein Disulfide Isomerase*), les TMX (*Thioredoxin-related transmembrane proteins*) et l'ERp18. *In vitro*, c'est le dithiothréitol (DTT) qui est utilisé en partenaire protéique de l'activité enzymatique de VKORC1 (Tie et Stafford, 2017).

La protéine VKORC1 a été découverte chez de nombreux organismes vivants (vertébrés, insectes, eubactéries, archées, plantes). Tout comme la vitamine K représente un groupe de molécules, la protéine VKORC1 rassemble un autre groupe de protéines homologues, dont certaines sont orthologues, et au moins une d'entre elle est paralogue (elle est issue de la duplication d'un gène ancestral). C'est le cas de la protéine VKORC1L1 (VKORC1 like protein 1), qui est retrouvée chez les oiseaux, les reptiles et les mammifères. La structure de cette protéine est très proche de celle de VKORC1, mais possède cependant des propriétés biologiques différentes. En effet, il semblerait qu'elle intervienne dans la protection des cellules contre le stress oxydatif, mais le mécanisme exact n'est pas encore clairement établi à ce jour (Cao *et al.*, 2016 ; Oldenburg *et al.*, 2015).

Le gène codant la protéine VKORC1 a donc été découvert par deux équipes distinctes (cf II.c.2.i). Les séquences de plusieurs espèces ont été déterminées par RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) et par analyses informatiques à partir de séquence de référence. Le tableau ci-après présente une liste non exhaustive de séquence de VKORC1 chez différents organismes.

**Tableau 3** : Présentation de quelques séquences du gène VKORC1 chez différentes espèces animales (d'après NCBI, GenBank)

Nom commun de l'espèce	Nom latin de l'espèce	Localisation du gène (chromosome)	Taille (pb)	Nombre d'exon
<b>Homme</b>	<i>Homo sapiens</i>	16	5126	3
<b>Rat brun</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	1	2522	3
<b>Souris domestique</b>	<i>Mus musculus</i>	7	2555	3
<b>Cheval</b>	<i>Equus caballus</i>	13	2194	3
<b>Vache</b>	<i>Bos taurus</i>	25	2280	3
<b>Chien</b>	<i>Canis lupus familiaris</i>	6	2057	3

La connaissance de la séquence d'ADN codant la protéine VKORC1 a rendu plus facile les études menées sur les différents phénotypes de sensibilité/résistance en fonction du génotype des individus.

Nous avons vu dans ce chapitre que le phénomène d'hémostase est en fait un vrai équilibre entre « coagulation » et « fibrinolyse ». La régulation de ce phénomène est très fine et très précise, à plusieurs échelles, allant même jusqu'à une échelle génétique de régulation par l'intervention du gène et de la protéine VKORC1. Les troubles de l'hémostase, qu'ils soient congénitaux ou acquis, sont répertoriés chez plusieurs espèces, et sont très nombreux. Ici, nous nous contenterons d'aborder les maladies thrombotiques qui nécessitent l'administration de molécules anticoagulantes.

## II. Les anticoagulants antivitamine K (AVK)

A ce jour, les études menées sur les anticoagulants montrent que ceux-ci peuvent se diviser en trois catégories (Hamy, 2006) :

- Les anti-thrombotiques : ils agissent au niveau des plaquettes en inhibant leur fonction dans l'organisme (exemple : acide acétylsalicylique dans l'aspirine)
- Les héparines et les antivitamine K : ces molécules interviennent respectivement sur les facteurs de coagulation et sur leur modification post-traductionnelle
- Les fibrinolytiques : celles-ci agissent en stimulant la fibrinolyse, étape 4 de l'hémostase (exemple : streptokinase, urokinase)

En thérapeutique humaine, les molécules les plus utilisées font partie des deux premières catégories, c'est-à-dire les héparines, l'aspirine, les antivitamine K (Pinède et Ninet, 1997), ainsi que les anticoagulants per-os (même si leur efficacité est encore discutée) (Laroche *et al.*, 2016 ; Laroche *et al.*, 2018). Aujourd'hui, l'utilisation des fibrinolytiques est réservée aux patients dont le pronostic vital est engagé. Cependant, en médecine vétérinaire, l'utilisation de toutes ces molécules est encore assez limitée, dans la mesure où il n'existe aucune AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). Les AVK sont majoritairement utilisés dans les mesures de lutte contre les rongeurs nuisibles. Mais ces mesures de lutte entraînent également des intoxications involontaires sur l'homme et sur d'autres mammifères. Dans ce contexte, nous présenterons dans cette partie l'utilisation des AVK en médecine vétérinaire, en dressant le parallèle inévitable avec la médecine humaine.

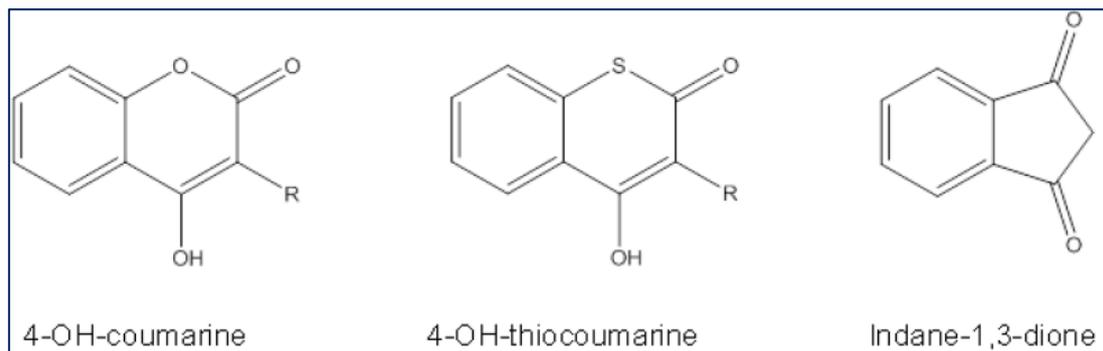
### II.a. Présentation des différents antivitamine K (AVK) et de leur mécanisme d'action

Les recherches sur les anticoagulants ont débutées dans les années 1920 aux Etats-Unis. En effet, à cette période, des cas de mortalité par hémorragies internes sur de jeunes bovins ont été rapportés, alors que ceux-ci avaient ingéré du mélilot fermenté. La molécule responsable de ces intoxications a été isolée et identifiée en 1940 : le dicoumarol a alors été découvert. Quelques années plus tard, à partir du dicoumarol, les scientifiques ont découvert et synthétisé la warfarine, qui est elle aussi un AVK. Les études sur cette catégorie de molécules se sont beaucoup développées entre les années 1950 et les années 1960 (Montastruc *et al.*, 2015), ce qui a permis de classer les AVK en deux catégories :

- Les AVK dits de « 1<sup>ère</sup> génération » : la toxicité de ces substances est modérée avec une DL<sub>50</sub> de 50mg/kg (Gulati et Gulati, 2018), une demi-vie assez courte (une semaine) et une rémanence dans l'organisme courte également. Dans cette famille de molécules, nous pouvons citer la warfarine ou coumafène, la coumatétralyle, le moumachlore et le coumafuryle, qui sont les molécules les plus anciennes (Valchev *et al.*, 2008)

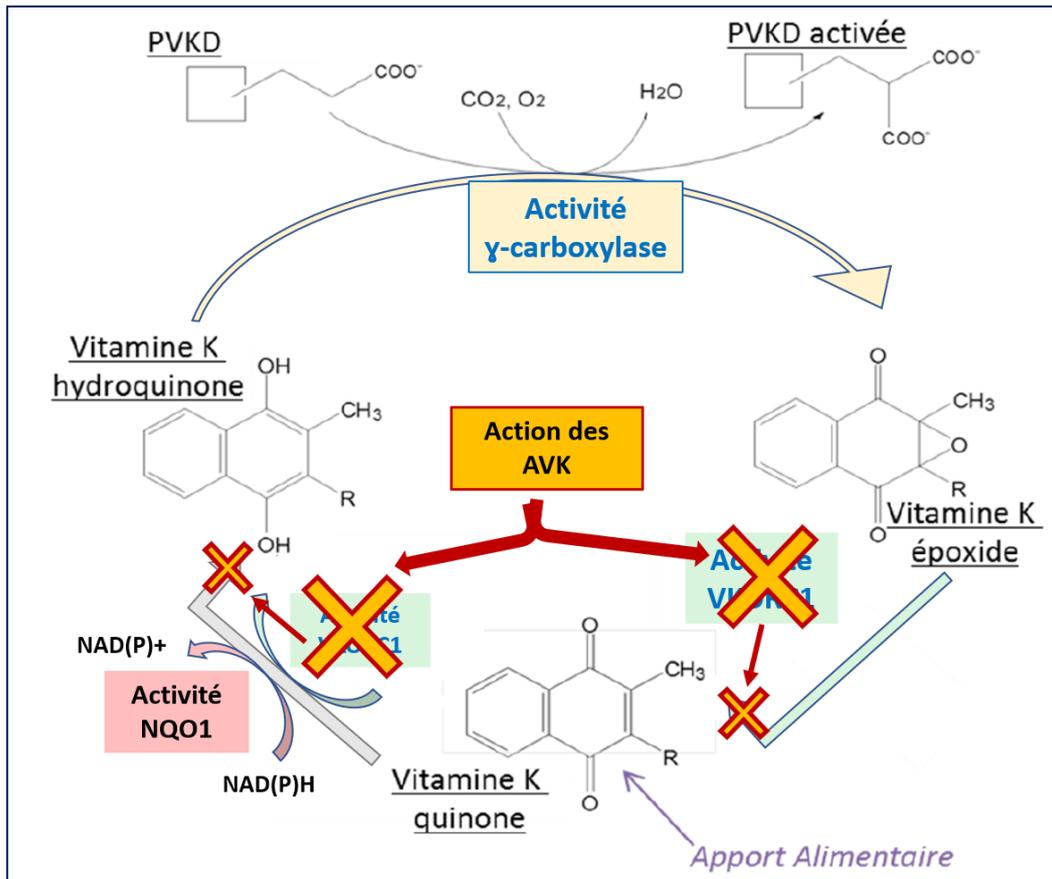
- Les AVK dits de « 2<sup>ème</sup> génération » : ces molécules sont plus toxiques car elles ont une DL<sub>50</sub> inférieure à 5mg/kg, voire inférieure à 1mg/kg pour les molécules les plus récentes appelées « superwarfarine » (Murphy, 2018). Leur demi-vie est plus longue (deux à trois semaines) ce qui rend leur rémanence dans l'organisme plus longue également. Dans cette famille, nous pouvons citer le brodifacoum, le bromadiolone, le difénacoum, le diféthialone et les dérivés de l'indandione.

Aujourd'hui, beaucoup de molécules AVK ont été isolées et synthétisées. Elles peuvent également se différencier avec de leur composition chimique (Murphy, 2018) : par exemple, les dérivés de l'indandione et les hydroxycoumarines sont présentées dans la figure 10.



**Figure 10** : Comparaison des noyaux hydroxycoumarines et indandione (Valchev et al, 2008)

Concernant le mécanisme d'action des AVK (figure 11), on sait aujourd'hui qu'ils agissent en inhibant l'activité de VKORC1, mais le mécanisme précis est encore mal connu. Etant donné que les noyaux de la vitamine K et des AVK présentent une forte ressemblance chimique (Jin et Gopinath, 2016), on suspecte qu'il y ait une inhibition compétitive de la part des AVK. Ceci entraîne une interruption du cycle de la vitamine K, et donc une déplétion de vitamine K hydroquinone (forme activée). Par conséquent, les PVKD ne sont plus carboxylées et n'acquièrent pas leur activité biologique. Il en découle rapidement de réels troubles de la coagulation et l'apparition d'hémorragies.



**Figure 11** : Illustration de l'action des AVK dans le cycle de la vitamine K (Hammed, 2014)

Nous avons vu précédemment que les molécules les plus efficaces sont les AVK de deuxième génération. En effet, ces molécules possèdent une plus grande affinité pour la protéine VKORC1 ainsi qu'une capacité à bloquer le cycle de la vitamine K à plusieurs niveaux. En ce qui concerne leur métabolisation, elles sont accumulées au niveau du foie, et leur temps de demi-vie est plus long grâce à un cycle entéro-hépatique et/ou une forte lipophilie (Murphy, 2018). Cette lipophilie associée à leur caractère d'acide faible fait que l'absorption intestinale des AVK est rapide et quasi-totale (notons que l'absorption des AVK peut être également respiratoire ou per-cutanée (Gamelin et Harry, 2005). Pour pouvoir être distribués dans les tissus, les molécules AVK se lient aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine. Etant donné que les AVK agissent principalement au niveau hépatique, c'est vers le foie que les molécules sont majoritairement distribuées.

## **II.b. Lien entre les AVK et la médecine vétérinaire**

### **II.b.1. Utilisation thérapeutique des AVK**

Depuis les années 1960, les AVK sont utilisés comme traitement de référence en médecine humaine, avec environ 1% de la population française traitée (Desmard *et al.*, 2009).

Cependant, avec le développement des anticoagulants oraux directs (inhibiteurs spécifiques du facteur II ou X par exemple (Chadha et Bharadawaj, 2017), ce chiffre diminue (ANSM, 2014). La liste des AVK utilisés en France ainsi que leurs indications thérapeutiques est présentée dans le tableau 3.

**Tableau 4** : Liste des AVK utilisés en France (d'après l'ANSM, 2014)

Famille pharmacologique	Dénomination commune internationale	Nom commercial	Indications
Coumariniques	Acénocoumarol	Sintrom® 4mg	- <u>Cardiopathie emboligène</u> : préventions des complications thrombo-emboliques associées à des troubles du rythme auriculaire, certaines valvulopathies mitrales, et prothèses valvulaires
		Minisintrom® 1mg	
	Warfarine	Coumadine® 2mg	- <u>Prévention des complications thrombo-emboliques des infarctus du myocarde</u> : thrombus mural, dysfonctionnement ventriculaire gauche sévère...
		Coumadine® 5mg	
Dérivés de l'indandione	Fluindione	Previscan® 20mg	- <u>Traitement des thromboses veineuses profondes et de l'embolie pulmonaire, ainsi que de leur récurrences (en relais de l'héparine)</u>

En médecine vétérinaire, il n'existe aucune AMM pour les molécules citées précédemment, ce qui rend l'utilisation des anticoagulants beaucoup moins fréquente (seule l'aspirine possède une AMM pour les animaux de rente).

La principale utilisation des AVK chez les animaux est dans le cadre du traitement des maladies thrombo-emboliques, tout en respectant le principe de la cascade pour l'utilisation de molécules humaines. Le terme « maladie thrombo-embolique » rassemble l'ensemble des troubles de la coagulation entraînant la formation d'un caillot sanguin, souvent transformé en embolie. Si celui-ci est trop grand par rapport au vaisseau impliqué, il y aura un arrêt de la circulation dans la zone anatomique concernée (Cunningham et Roderick, 2016). La formation d'un thrombus veineux est due à un croisement entre trois phénomènes, appelé « la triade de Virchow » : état d'hypercoagulabilité, une modification de l'hémodynamie sanguine (stase et/ou turbulence) et une altération de l'endothélium vasculaire (Wolberg *et al.*, 2012). Les cas de maladies thrombo-emboliques sont beaucoup plus fréquents en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Cependant, il existe trois pathologies dominantes chez les animaux : la thrombo-embolie aortique chez le chat (beaucoup plus rare chez le chien), la thrombophlébite jugulaire chez le cheval et la thrombose de la veine cave caudale chez les bovins (Gerspach *et al.*, 2011).

Chez les bovins, la thrombose de la veine cave caudale est une affection qui reste sporadique (prévalence de 1,3 à 4,4%), qui se caractérise par la formation et la persistance d'un thrombus septique dans la veine cave caudale (plus rarement dans la veine cave crâniale), c'est-à-dire un thrombus blanc contenant des plaquettes et des leucocytes. Ce thrombus se forme à la suite d'une infection primaire dans l'organisme, comme par exemple un abcès hépatique (Perriot, 2017). La présence de ce thrombus provoque des lésions cardiaques (endocardite végétante de la valve tricuspide) ainsi que des lésions pulmonaires (anévrismes, pneumonies suppurées et nécrotiques, abcès). Ainsi, les signes cliniques associés sont souvent frustrés (perte de poids chronique, faiblesse, baisse d'appétit, fièvre parfois). De par la localisation des lésions, ils peuvent être associés à des signes respiratoires (jetage purulent, tachypnée, bruits respiratoires, voire détresse respiratoire et épistaxis) ou de l'ascite (si le thrombus est situé crânialement au foie). Dans le cas d'hémorragies pulmonaires importantes, les animaux meurent subitement et sont retrouvés avec une flaque de sang près d'eux (Perriot, 2017). Pour le diagnostic de la thrombose de la veine cave caudale, mise à part l'examen nécropsique de l'animal, l'examen de choix est l'échographie transcutanée du foie et de la veine cave caudale.

En ce qui concerne le traitement de cette affection, il existe dans la littérature, un seul cas de thrombose de la veine cave non décédé naturellement (Sigrist *et al.*, 2008). Le patient a été admis à l'Université de Montréal car il présentait une baisse de production et une fièvre intermittente, ne répondant pas aux antibiotiques. A son admission, il présente une tachycardie ainsi que des bruits respiratoires. Le diagnostic fut permis grâce à une échographie per-opératoire. Même si le pronostic était sombre, un traitement antibiotique fut mis en place (oxytétracycline à 10mg/kg pendant 18 jours, puis ampicilline à 10mg/kg pendant 10 jours) associé à un traitement diurétique (furosémide) et antalgique (morphine). Cependant, l'état de l'animal ne s'améliorait pas, l'euthanasie fut réalisée. Un traitement anticoagulant aurait pu être administré (aspirine 10mg/kg *per os*), mais son efficacité n'était pas encore démontrée chez les bovins (Constable *et al.*, 2017 ; Simpson *et al.*, 2012). Le traitement cette affection et des abcès hépatiques étant difficile, il est plus aisé de prévenir leur développement. Il convient dans ce cas de commencer par traiter correctement les foyers septiques primaires (comme des mammites ou les affections podales) en utilisant une antibiothérapie adaptée. Ensuite, il est nécessaire d'empêcher le développement de ruminite et d'abcès hépatique. En France, seule la gestion de l'alimentation permet de prévenir l'apparition de ces affections, le but étant de limiter les acidoses ruminales grâce à des rations équilibrées en quantité suffisante, plus ou moins complémentées avec des tampons alimentaires (exemple : bicarbonate de sodium).

Chez les chats, la prévalence de la thrombo-embolie aortique (ou aortico-iliaque) peut aller de 0,06 à 0,3% (Borgeat *et al.*, 2014). Elle touche préférentiellement les chats atteints de cardiopathie ou d'hyperthyroïdisme (Cunningham et Roderick, 2016). Dans cette pathologie, un embolo passe dans la circulation générale et vient se bloquer au niveau de la bifurcation entre l'artère aorte et l'artère iliaque, de manière uni ou bilatérale. Les signes cliniques sont alors assez caractéristiques : une douleur vive et aiguë provoquée par une neuropathie ischémique secondaire, une parésie voire paralysie des postérieurs accompagnée plus ou moins d'une disparition du pouls fémoral.

Les membres atteints deviennent froids, et les coussinets sont pâles ou congestionnés (Jandrey, 2012). Un traitement doit être administré en urgence pour gérer la douleur (exemple : buprénorphine). Ensuite, un traitement anticoagulant doit être entrepris : il consiste en général en l'administration d'héparine pour prévenir l'expansion du caillot. Il est possible d'ajouter à cette thérapie un antiagrégant plaquettaire pour dissoudre le caillot, mais, en plus du coût élevé de ce type de molécule, les risques de lésions de reperfusion sont plus élevées (Cunningham et Roderick, 2016).

Le principal problème concernant l'utilisation des AVK en médecine vétérinaire est la difficulté d'un suivi thérapeutique précis. En effet, les formes galéniques des molécules humaines ne sont pas adaptées aux animaux domestiques, et le traitement devrait être administré à heures fixes, tous les jours, pendant toute la durée du traitement. De plus, il faut savoir que les AVK représentent la première cause de morts et d'accidents iatrogènes chez l'homme (Faure, 2013), malgré le fait que les recherches soient vraiment développées sur ce domaine (ce qui n'est pas le cas en médecine vétérinaire). Le suivi des patients sous traitement AVK se fait en calculant une valeur appelée « INR » pour « *International Normalized Ratio* » (Pinède et Ninet, 1997) :

$$INR = \left( \frac{\text{Temps de quick du patient}}{\text{Temps de Quick du témoin}} \right)^{ISI}$$

L'ISI est l'Index de Sensibilité Internationale. Il prend en compte les variations entre les réactifs utilisés par le fabricant des instruments de mesure en fonction de l'espèce (humain, lapin ou bovin), et permet alors d'uniformiser les valeurs entre les patients.

Chez un patient sain, l'INR est égal à 1. Les patients sous traitement visent à stabiliser un INR entre 2 et 3 en modifiant progressivement le dosage des AVK et en recalculant l'INR tous les deux à trois jours. Chaque calcul d'INR est accompagné d'une prise de sang, ce qui explique que le suivi des animaux domestiques est particulièrement difficile.

### **II.b.2. Les intoxications aux AVK**

Nous avons vu précédemment que les AVK ne sont que très peu utilisés en thérapie vétérinaire. Cependant, ces molécules sont souvent impliquées dans des pathologies d'intoxications, notamment dans le cas d'intoxications aux rodenticides chez les carnivores domestiques. Le mécanisme de l'hémostase sanguine étant quasiment identique chez tous les vertébrés, le mécanisme d'action des AVK est également similaire dans tous les organismes (Shore *et al.*, 2018) : les plus impactées sont les espèces qualifiées de « non-cibles », c'est-à-dire le chien, le chat, l'Homme, les mammifères sauvages ainsi que les reptiles et les oiseaux. Ainsi, l'utilisation des AVK est soumise à des réglementations (exemple européen : Biocidal Products Regulation), car ces molécules représentent un potentiel danger pour l'environnement et les écosystèmes (Shore *et al.*, 2018).

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les cas d'intoxications sont beaucoup plus nombreux chez les chiens que chez les chats (Brown *et al.*, 2015), le plus souvent par ingestion directe des appâts pour les rongeurs. En effet, les chiens sont des patients beaucoup plus gloutons et très curieux, alors que les chats sont une espèce particulièrement méfiante en terme de nourriture. Ces différences de comportements alimentaires font que les intoxications canines sont plutôt primaires, alors que les intoxications félines sont souvent secondaires. Le tableau 5 présente les doses létales de quelques AVK pour le chien et le chat.

**Tableau 5** : Mécanismes d'action, pathogénies et doses létales de quelques AVK chez le chien et le chat (d'après Brown *et al.*, 2015)

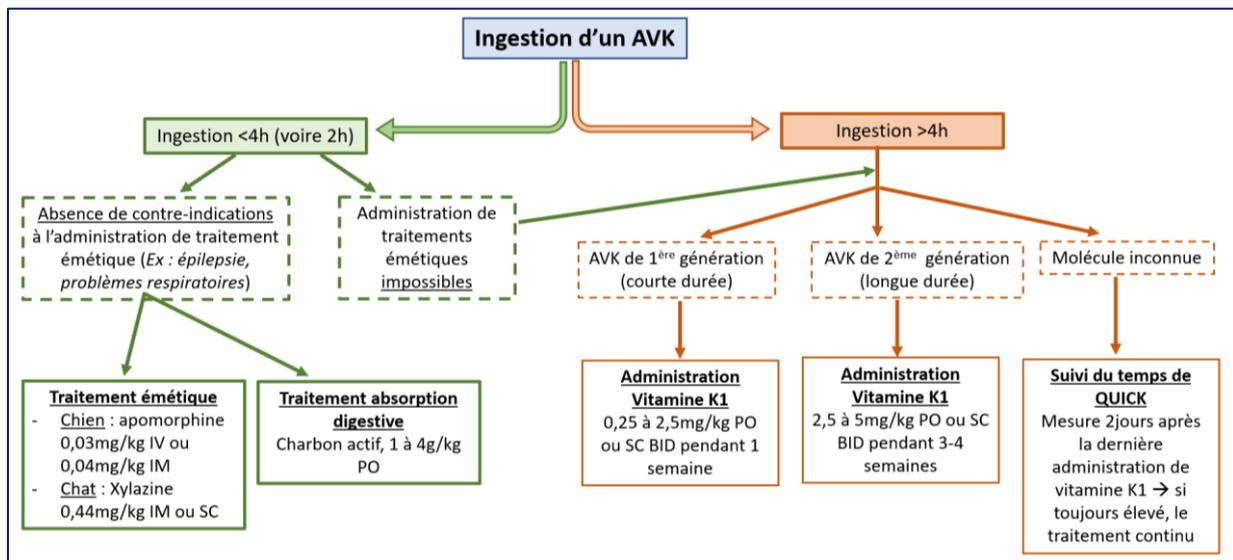
Nom de l'AVK	Classe	Mécanisme d'action	Conséquences pathologiques	Doses létales (mg/kg)	
				Chien	Chat
<b>Brodifacoum</b>	Hydroxycoumarine de 2 <sup>e</sup> génération	Inhibition de l'activité VKORC1 et arrêt du cycle de la vitamine K	Troubles de la coagulation et hémorragies	0,2 - 4	25
<b>Bromadiolone</b>				11 - 15	>25
<b>Chlorophacinone</b>	Dérivés de l'indandione			NR	NR
<b>Diphacinone</b>				0,9 - 8	15
<b>Warfarine</b>	Hydroxycoumarine de 1 <sup>ère</sup> génération			20 - 300	5 - 30

Légende : NR = Non Renseigné

Les troubles de la coagulation entraînant des hémorragies des grandes cavités (hémothorax et hémopéritoine), plusieurs signes cliniques peuvent être observés : des problèmes respiratoires, de l'ascite, des saignements au sein d'autres organes (péricarde, système nerveux, intra-articulaires...), une anémie secondaire entraînant une pâleur des muqueuses ou un ictère, des troubles du rythme cardiaque, de l'abattement et une intolérance à l'effort (Murphy, 2018 ; Brown *et al.*, 2015). Cependant, tous les signes cliniques énoncés ne sont pas pathognomoniques d'une intoxication aux AVK. Elle entre dans le diagnostic différentiel de plusieurs pathologies : la CIVD (coagulation intra-veineuse disséminée), certaines néoplasies, une thrombocytopenie sévère, l'hémophilie ou une insuffisance hépatique (Brown *et al.*, 2015).

Les premiers examens complémentaires à réaliser pour éliminer certaines pathologies et poser un diagnostic sont une numération formule sanguine ainsi qu'un frottis sanguin (les intoxications aux AVK peuvent également entraîner une thrombocytopenie du fait de l'importante mobilisation des plaquettes pour combler les hémorragies). Il est aussi possible de comparer les temps de coagulation, c'est-à-dire les Temps de Quick (TQ, qui représente la quantité de facteur II) et le Temps de Céphaline Activée (TCA). En effet, dans le cas d'une intoxication aux AVK, le facteur II sera le premier à être épuisé (à cause de sa demi-vie courte de 6,2h chez le chien). Ainsi, le TQ sera bien plus élevé que le TCA (si TQ=TCA, il est impossible de conclure ; si TCA>TQ, alors l'hypothèse d'intoxication aux AVK est réfutée) (Brown *et al.*, 2015).

La prise en charge d'une intoxication aux AVK diffère en fonction de la substance ingérée, de sa quantité et du délai entre l'ingestion et la présentation de l'animal chez le vétérinaire (les signes cliniques peuvent mettre plusieurs jours à apparaître). Ceci est présenté dans la figure 12.



**Figure 12** : Présentation des différentes prises en charge possibles dans le cadre d'intoxication aux AVK (Albistur A.)

La vitamine K1 utilisée dans le traitement des intoxications aux AVK est une molécule de synthèse appelée « phytonadione ». Dans la plupart des RCP (Résumé des Caractéristiques du Produit), les voies d'administration indiquées sont les voies IV (intraveineuse) lente ou IM (intramusculaire). Cependant, certains cas d'hémorragies et de chocs anaphylactiques ont été rapportés suite à l'administration selon l'une ou l'autre de ces deux voies (Murphy, 2018). Enfin, il sera possible d'ajouter à ces prises en charge des traitements complémentaires si l'état de l'animal le nécessite. Ainsi, les intoxications peuvent nécessiter une thoracocentèse, abdominocentèse ou péricardiocentèse, une transfusion de plasma frais de 10 à 20mL/kg (qui permettront l'apport de facteur de coagulation), une transfusion de sang total de 20 à 40mL/kg (en cas d'anémie sévère), ou encore de l'oxygénothérapie (en cas d'hypoxémie) (Brown *et al.*, 2015). Les intoxications aux AVK représentent les causes de coagulopathies sévères avec le meilleur pronostic lorsqu'elles sont traitées à temps et correctement. En effet, lors de l'étude menée par Waddell en 2013, 75 chiens sur 76 ont survécu à une intoxication aux AVK après avoir reçu le bon traitement, ce qui représente un taux de survie de 98,6% (Brown *et al.*, 2015).

Contrairement aux carnivores domestiques, les intoxications des rongeurs sont plutôt volontaires, que ce soit dans les milieux domestiques, industriels ou agricoles, afin de réguler les populations de nuisibles qui ont un impact économique (destruction de marchandise et d'infrastructures), écologique et sanitaire (transmission de maladies virales, bactériennes ou parasitaires) (Shore *et al.*, 2018). La plupart des molécules utilisées sont les rodenticides anticoagulants AVK, mais il existe aussi des molécules non anticoagulantes (exemples : calciférol, chloropicrine) (Gamelin et Harry, 2005).

De par leur proximité avec les habitations, les populations de rat brun (*Rattus norvegicus*), de rat noir (*Rattus rattus*) et de souris grise (*Mus musculus*) furent pendant longtemps régulées avec le dicoumarol et la warfarine, mais désormais on a plutôt recours aux superwarfarines (Shore *et al.*, 2018). Les produits commercialisés sont présentés sous différentes formes, en fonction de la concentration de la molécule et de l'appétence du produit (Gamelin et Harry, 2005) :

- Les appâts prêts à l'emploi : souvent sous forme de céréales enrobées ou de granulés, ils sont plutôt faiblement dosés (de 0,0025% à 0,0375%),
- Les poudres de piste : elles sont réservées aux professionnels et déposées sur le passage fréquent des rongeurs ; ils s'intoxiquent en se léchant ensuite. Elles sont beaucoup plus concentrées (de 0,2% à 1%),
- Les concentrats huileux : composés de chlorophacinone, ils étaient également utilisés par les professionnels, mais ne sont plus sur le marché français, car cette molécule est interdite d'utilisation depuis 2009 par l'AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments).

La plupart du temps, les individus intoxiqués meurent d'hémorragies mortelles, entre 4 et 10 jours après ingestion des molécules incriminées (Shore *et al.*, 2018). Ce mode d'intoxication est décrit comme « à retardement », car les populations de rongeurs utilisent un système de « rat testeur ». En effet, si ce dernier meurt trop rapidement après l'ingestion, le reste de la colonie délaie la nourriture mise en cause : c'est ce qu'on appelle « l'aversion alimentaire » (Hodroge, 2011).

## **II.c. Réponses des organismes aux AVK : constat d'une variabilité de réaction chez l'Homme et l'animal**

Tout comme chez l'Homme, des différences de réponses des organismes aux AVK ont été constatées chez les animaux, ce qui provoque des problèmes dans plusieurs domaines. Tout d'abord, chez les patients humains, certaines résistances aux traitements anti-coagulants ont été mises en évidence : elles posent problème pour la prise en charge thérapeutique des patients atteints de maladies thromboemboliques en provoquant des réactions d'hypersensibilités, et donc des hémorragies iatrogènes. De la même façon, des variations de réponses ont été remarquées chez les animaux, notamment dans les campagnes de lutte contre les rongeurs nuisibles où de plus en plus de résistance aux molécules se développent. Les mécanismes de résistances peuvent s'expliquer par deux phénomènes : une différence directement au niveau du métabolisme de l'AVK, ou au niveau d'un polymorphisme génétique, notamment du gène *VKORC1*.

### **II.c.1. Le métabolisme des AVK et leurs interactions dans l'organisme**

Même si l'utilisation des AVK est fréquente en thérapeutique humaine, l'utilisation de ces molécules reste délicate. En effet, non seulement les motifs approuvant leur utilisation sont rares, mais il existe aussi de nombreuses variations de réponse au traitement inter et intra-individuelles (Siguret *et al.*, 2007), dues à des interactions métaboliques chez les patients traités.

Une des premières causes de variations de réponses aux AVK sont les interactions médicamenteuses. En effet, nous avons vu que les AVK se lient aux protéines plasmatiques pour circuler dans les organismes. Ainsi, certaines molécules médicamenteuses étant capables de se lier aux mêmes protéines, la fraction libre des AVK dans le sang augmente et leur action est perturbée. De plus, les isoenzymes du cytochrome P450 qui interviennent dans le métabolisme des AVK interviennent aussi dans le métabolisme de certains médicaments, ce qui diminue la biodisponibilité de ces enzymes pour la catalyse des AVK (Faure, 2013). En plus des interactions médicamenteuses mises en évidence, les réponses thérapeutiques lors d'utilisation des AVK varient en cas de pathologies existantes (exemples : insuffisances hépatique, rénale, cardiaque...) (Siguret *et al.*, 2007 ; Faure, 2013). Enfin, il a été montré que le régime alimentaire des patients (qui est supposé être pauvre en légumes verts afin de limiter les apports de vitamine K) intervient également dans la réponse des organismes aux traitements anticoagulants. Certaines études ont montré que ces apports ne doivent pas être nuls, mais plutôt constants sans être excessifs, pour limiter les fluctuations de l'INR (Bal et Drouet, 2009 ; Siguret *et al.*, 2007). D'autres aliments, comme les aliments gras, sont susceptibles de modifier l'absorption de la vitamine K ou des AVK. Finalement, les patients traités aux AVK doivent adopter une certaine hygiène de vie. Cependant, les facteurs environnementaux et démographiques ne sont pas les seuls facteurs à intervenir dans la variation de réponse des organismes aux AVK.

## **II.c.2. Mutation du gène *VKORC1* et résistances aux AVK**

### **II.c.2.i. Découverte d'un mécanisme de résistance aux AVK**

Les études visant à identifier le gène codant pour la protéine VKORC1 ont débuté dès 1958, suite au constat de l'existence d'une résistance des organismes aux AVK de 1<sup>ère</sup> génération (comme la warfarine). En effet, ce mécanisme de résistance a été observé, dans un premier temps, chez les rats bruns et les souris domestiques en Ecosse (Boyle, 1960 ; Pelz *et al.*, 2005), puis dans d'autres pays européens, avant de s'étendre à l'échelle mondiale (Pelz *et al.*, 2005 ; Buckle et Smith, 2015 ; Hodroge, 2011). Ces recherches ont montré que certaines mutations responsables de modifications au niveau de la séquence en acides aminés (exemple : Substitution Val29Leu) entraînaient une réponse différente aux substances coumariniques (Garcia et Reitsma, 2008). D'autres recherches ont montré que l'acide aminé 139 (généralement une tyrosine) faisait partie du site de fixation des AVK, car :

- Chez les rats résistants à la warfarine, une mutation génétique entraînait une substitution de cette tyrosine par une phénylalanine.
- La tyrosine en position 139 forme un motif TYA (thréonine/tyrosine/alanine). Cet enchaînement d'acides aminés est retrouvé dans la séquence de la NQO, et a été identifié comme site de fixation de la warfarine (Oldenburg *et al.*, 2007).

Les premières recherches ont été menées par Greaves et Ayres en 1967. Ils se sont penchés sur la génétique liée à cette résistance. Dans un premier temps, les deux chercheurs ont étudié la mortalité de rats issus de croisements en retour successifs entre des rats résistants et des rats standards de laboratoire, sensibles aux AVK et ayant reçu une alimentation enrichie en warfarine.

Cette première étude a conduit à la découverte d'un « allèle de la résistance », de localisation autosomique et à pénétrance complète. Par la suite, une injection de warfarine fut réalisée sur des rats issus de la 5<sup>ème</sup> génération de croisement, leur taux de prothrombine a été mesuré 24h avant et 24 après l'injection, puis ils ont ensuite reçu le même régime alimentaire que les rats de la première étude. L'analyse du taux de mortalité a montré que la résistance présente n'était pas due à un trouble au niveau de l'absorption intestinale. Ces deux études ont confirmé l'hypothèse d'une origine génétique à cette résistance (Greaves et Ayres, 1967). Cependant le caractère héréditaire de cette résistance étant apparu instable, elle pourrait en fait être multifactorielle (Pelz et *al.*, 2005 ; Buckle et Smith, 2015). Ainsi, les recherches visant à caractériser cette résistance se sont poursuivies et ont abouti à l'établissement d'une définition établie par Greaves en 1994. Celle-ci prenait en compte les trois éléments fondamentaux à considérer dans la résistance aux AVK (Hodroge, 2011 ; Buckle et Smith, 2015) :

*« La résistance aux AVK se traduit par une perte majeure d'efficacité dans des conditions pratiques d'utilisation où ces derniers ont été utilisés convenablement. Cette perte d'efficacité, qui se retrouve chez des lignées de rongeurs présentant une sensibilité réduite aux AVK, résulte d'un caractère génétiquement transmissible, et est plus ou moins importante en fonction de ce caractère ».*

Les AVK dits de « 1<sup>ère</sup> génération » ont commencé à être développés à la fin des années 1940, pour remplacer des poisons déjà existants (comme la strychnine). Mais leur commercialisation a entraîné l'apparition de phénomènes de résistance chez les rongeurs dans différentes zones géographiques, ce qui dans les années 1970 et 1980 a motivé le développement de nouvelles molécules d'AVK dites de « 2<sup>ème</sup> génération ». Parmi ces molécules, nous pouvons citer le difénacoum et la bromadiolone, suivis par le brodifacoum, le flocoumafène, la diféthialone. Ces trois dernières molécules font partie des plus puissantes car l'ingestion seule du produit entraîne la mort (Pelz et *al.*, 2005). Malheureusement, de nouveaux phénomènes de résistance ont également commencé à se développer rapidement après la commercialisation de ces AVK de 2<sup>ème</sup> génération.

La communauté scientifique n'est pas unanime quant aux mécanismes impliqués dans la résistance à ces AVK : certains pensent qu'ils seraient dus à une mauvaise utilisation, d'autres à une mauvaise application ou encore à une résistance physiologique réelle (Hodroge, 2011). Quoi qu'il en soit, ces mécanismes de résistance demeurent toujours un enjeu économique et sanitaire, en plus d'être un véritable déficit scientifique à élucider. Parallèlement aux recherches effectuées sur les rongeurs, certaines résistances aux AVK ont commencé à être rapportées chez l'Homme à partir de 1964 (Bodin et *al.*, 2005). En effet, ces résistances ont été mises en évidence chez des patients recevant des AVK de manière préventive ou pour traiter des maladies thromboemboliques diverses. De ce fait, ces résistances ont rapidement été perçues comme un véritable enjeu pour la santé humaine mais aussi comme enjeu économique (Kohn et Pelz, 1999). Par extrapolation des recherches menées chez les rongeurs, la résistance aux AVK chez l'Homme semblait suivre le même mode de transmission (allèle autosomique dominant) (Buckle et Smith, 2015).

Pour les rongeurs, les scientifiques ont commencé par discriminer les individus résistants grâce à un test de coagulation (Gill et *al.*, 1993 ; Gill et *al.*, 1994), avant d'utiliser la cartographie génique avec des marqueurs microsatellites. L'association de ces deux techniques leur a permis dans un premier temps de déterminer la localisation chromosomique du locus recherché (chromosome 6), avant de trouver sa position précise dans le génome, ainsi que sa taille. Chez l'Homme, les études ont été menées à partir de données déjà existantes sur des patients atteints de troubles de la coagulation. En effet, des recherches ont réalisées sur deux familles présentant des troubles rares de l'hémostase (hémorragies intracrâniennes dans la première année de vie), dus à une déficience familiale en facteurs de coagulation vitamine-K dépendants (Fregin et *al.*, 2002), (facteurs II, VII, IX, X ainsi que les protéines C et S). Chez ces mêmes patients, un traitement oral à base de vitamine K1 supprimait les symptômes, ce qui indiquait une atteinte directe de la protéine à activité VKOR. Ce caractère se transmettait également selon un mode autosomique récessif (Oldenburg et *al.*, 2007).

Ces deux études (sur les rongeurs et sur l'Homme) mises en parallèle ont permis d'identifier le gène concerné. En 2004, l'équipe allemande de Rost séquençait les chromosomes d'intérêt des sujets en fonction des espèces (le Chr 6 pour les rats, le Chr 16 pour l'homme), et mettait en évidence la présence d'une mutation faux-sens au niveau d'un gène, dont le rôle n'était pas encore établi (Rost et *al.*, 2004). La même année, l'équipe américaine de Li utilisait une méthode différente pour parvenir à identifier le gène incriminé. Ils commencèrent par analyser la région chromosomique d'intérêt (exemple : chez l'homme, zone péri-centromérique du chromosome 16 (Fregin et *al.*, 2002)), en référant les gènes potentiellement codants. De cette liste, ils éliminaient les gènes déjà connus et les gènes ne codant pas pour une protéine transmembranaire. Enfin, ils utilisent la méthode « *double-stranded si RNA* » (petits ARN interférents double brins) pour inhiber une éventuelle activité VKOR sur des cellules à forte activité protéique (chez l'homme, cellule de carcinome pulmonaire). Cette méthode permet d'isoler une seule des séquences restantes sur la listes initiale. Ils confirmèrent leur hypothèse en réalisant de l'expression protéique dans des cellules d'insecte dépourvues d'activité VKOR.

#### II.c.2.ii. Présentation du polymorphisme du gène *VKORC1* chez les rongeurs et l'Homme

Un polymorphisme génétique a été très rapidement suspecté. Même si le gène *VKORC1* n'avait pas encore été découvert, les scientifiques s'accordaient sur l'existence de plusieurs allèles : d'abord un « allèle écossais » (là où la résistance a été découverte), puis un « allèle gallois » (Greaves et Ayres, 1976), qui ont été suivis par les découvertes d'autres types d'allèles (Buck et Smith, 2015). La découverte du gène *VKORC1* a facilité les recherches sur le polymorphisme génétique et les mutations de ce gène ont pu être répertoriées et caractérisées. Leur action hypo-sensibilisante est alors démontrée chez les rongeurs. Pour étudier cette résistance, l'activité enzymatique de *VKORC1* a été étudiée de différentes façons :

- Sur des microsomes hépatiques (Hodroge, 2011),
- Grâce à la transfection de cellules eucaryotes humaines (Pelz *et al.*, 2005 ; Rost *et al.*, 2009 ; Müller *et al.*, 2014),
- Grâce à des levures recombinantes de type *Pichia pastoris* (Hodroge, 2011).

La liste des mutations protéiques découvertes chez les rongeurs est présentée dans le tableau 6.

**Tableau 6** : Présentation des mutations protéiques de VKORC1 chez *Rattus norvegicus*

Mutation	Résistance aux AVK	Vitamine K	Localisation
p.Arg33Pro Exon 1	1 <sup>ère</sup> G : confirmée pour warfarine 2 <sup>ème</sup> G : non étudiée	Activité de VKORC1 réduite de 40%	Non étudiée
p.Arg35Pro Exon 1	1 <sup>ère</sup> G : confirmée pour warfarine 2 <sup>ème</sup> G : non étudiée	Activité de VKORC1 presque nulle	Non étudiée
p.Ser56Pro Exon 1	Pas de résistance connue	Activité de VKORC1 presque nulle	Demi hélice luminale
p.Leu128Gln Exon 3	1 <sup>ère</sup> G : modérée 2 <sup>ème</sup> G : pas de résistance	Peu de variations dans les besoins en vitamine K → diminution de l'activité VKORC1 mais peu de production de 3'-OH-VitK	Boucle luminale
p.Tyr139Ser Exon 3	1 <sup>ère</sup> G : sévère 2 <sup>ème</sup> G : pas de résistance	Besoins en vitamine K x10 → diminution de l'activité VKORC1 et augmentation de production de 3'-OH-VitK	Touche le motif TYA (catalytique)
p.Leu120Gln Exon 3	1 <sup>ère</sup> G : modérée à sévère 2 <sup>ème</sup> G : résistance au difénacoum	Temps de coagulation augmenté	Hélices transmembranaires 2 ou 3 (selon modèle)
p.Tyr139Cys Exon 3	1 <sup>ère</sup> G : sévère 2 <sup>ème</sup> G : modérée	Augmentation des besoins en vitamine K et augmentation des temps de coagulation	Motif TYA (catalytique) de l'hélice transmembranaire 4 (ou 3 selon le modèle)
p.Tyr139Phe Exon 3	1 <sup>ère</sup> G : sévère 2 <sup>ème</sup> G : évoquée mais pas prouvée	Augmentation modérée des besoins en vitamine K	Motif TYA (catalytique) de l'hélice transmembranaire 4 (ou 3 selon le modèle)

En France, la mutation la plus retrouvée est la « Tyr139Ser », mais les autres sont aussi retrouvées (Pelz *et al.*, 2005 ; Hodroge, 2011 ; Rost *et al.*, 2009). Plusieurs mutations silencieuses ont également été identifiées même si elles n’ont pas été présentées ci-dessus (Rost *et al.*, 2009 ; Müller *et al.*, 2014). Ces mêmes mutations existent aussi bien à l’état homozygote qu’à l’état hétérozygote (Rost *et al.*, 2004 ; Rost *et al.*, 2009 ; Pelz *et al.*, 2005 ; Hodroge, 2011). Le développement de résistances génétiques aux AVK est un parfait exemple qui illustre le phénomène de « pression de sélection ». Les problèmes issus de ces adaptations puis de leur sélection dans ces populations de rongeurs sont multifactoriels, et ont des conséquences économiques, écologiques et de santé publique.

Chez l’Homme, avant que le gène *VKORC1* ne soit découvert, les scientifiques suspectaient l’existence de deux allèles : l’allèle *WR* conférant une hyposensibilité aux AVK, et l’allèle *VKCFD2* responsable de la maladie familiale de déficience multiple en facteurs de coagulation. Les études du gène *VKORC1* ont permis de découvrir que les résistances aux anticoagulants n’étaient pas dues qu’à un seul allèle, que le gène était bien pluri-allélique et que plusieurs variants de résistance aux AVK existaient (Rost *et al.*, 2004). De même que ce qui a été observé chez les rongeurs, ces études ont abouti à la description du polymorphisme du gène *VKORC1*, puisque cette question représentait un enjeu majeur pour les patients sous traitement. Une première étude faisait mention de deux halotypes : l’halotype A ou « *low dose* » où la dose thérapeutique de warfarine pour obtenir l’équilibre thérapeutique était basse, et un halotype B, qui correspondait à une résistance plus ou moins importante des patients (Rieder *et al.*, 2005 ; Siguret, 2007). D’autres études mentionnaient quatre halotypes notés *VKORC1*\*1, \*2, \*3, \*4. Ils correspondaient à la répartition mondiale des populations et à leur résistance. Par exemple, la population asiatique apparaît comme la plus sensible aux AVK alors que la population africaine serait la plus résistante (Geisen *et al.*, 2005 ; Oldenburg *et al.*, 2007).

A l’inverse des rongeurs, les mutations du gène *VKORC1* et donc les résistances des patients aux molécules anticoagulantes sont beaucoup plus rare, puisque la pression environnementale est différente : l’utilisation en médecine humaine est thérapeutique alors que chez les rongeurs, leur utilisation est uniquement dans un objectif de rodenticides. Les mutations nucléotidiques découvertes chez l’Homme sont présentées dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Présentation des mutations nucléotidiques et protéique du gène *VKORC1* chez l’Homme

Mutations nucléotidiques	Conséquence biologique	Localisation	Référence bibliographique
<b>g.497T&gt;G</b>	Hypersensibilité à la warfarine	Intron 1	Li, 2006
<b>g.1173C&gt;T</b>	Hypersensibilité à la warfarine et acénocoumarol	Intron 1	Li, 2006 ; Hodroge, 2011 ; Gaikwad et al, 2014
<b>g.1542G&gt;C</b>	Hypersensibilité à la warfarine	Intron 2	Li, 2006
<b>g.1639G&gt;A</b>	Hypersensibilité à la warfarine et acénocoumarol	Promoteur	Rieder et al, 2005 ;

			Oldenburg et al, 2007 ; Hodroge, 2011 ;
<b>Arg98Trp (c.292C&gt;T)</b>	Maladie familiale de déficience multiple en facteur de coagulation	Exon 3	Rost et al, 2004 ; Garcia et Reistma, 2008
<b>g.1320G&gt;A</b>	Non connue	Intron 1	Bodin et al, 2008
<b>Asp38Tyr</b>	Pas d'effet (uniquement warfarine testée)	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	D'Andrea et al, 2005
<b>Arg151Gln</b>	Pas d'effet (uniquement warfarine testée)	2 <sup>ème</sup> boucle cytosolique	D'Andrea et al, 2005
<b>g.676A&gt;G</b>	Augmentation de l'expression de VKORC1 → résistance warfarine, fluindione, acénocoumarol	Région promotrice	Bodin et al, 2008
<b>g.698C&gt;T</b>	Résistance warfarine	Intron 1	Li, 2006
<b>g.2255T&gt;C</b>	Résistance warfarine	Intron 2	Li, 2006
<b>Ala26Pro</b>	Résistance warfarine, fluindione	3'-UTR	Li, 2006 ; D'Andrea et al, 2005
<b>Ala26Thr</b>	Résistance phenprocoumone	TM1	Watzka et al, 2011
<b>Leu27Val</b>	Résistance warfarine légère, résistance fluindione	TM1	Watzka et al, 2011
<b>His28Gln</b>	Résistance phenprocoumone	TM1	Watzka et al, 2011
<b>Val29Leu</b>	Résistance warfarine non confirmée, résistance phenprocoumone	TM1	Rost et al, 2004 ; Bodin et al, 2005 ; Garcia et Reistma, 2008
<b>Asp36Tyr</b>	Résistance warfarine, acénocoumarol, fluindione	Exon 1	Bodin et al, 2008 ; Watzka et al, 2011
<b>Asp36Gly</b>	Résistance warfarine	Exon 1	Watzka et al, 2011
<b>Ala41Ser</b>	Résistance warfarine	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Watzka et al, 2011
<b>Val45Ala</b>	Résistance warfarine	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Rost et al, 2004 ; Bodin et al, 2005 ; Watzka et al, 2011
<b>Ser52Leu</b>	Résistance phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique, Exon 1	Watzka et al, 2011
<b>Ser52Trp</b>	Résistance phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique, Exon 1	Watzka et al, 2011
<b>Val54Leu</b>	Résistance warfarine, acénocoumarol, fluindione	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Bodin et al, 2008 ; Watzka et al, 2011

<b>Ser56Phe</b>	Résistance phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Watzka et al, 2011
<b>Arg58Gly</b>	Résistance warfarine	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Bodin et al, 2005 ; Garcia et Reitsma, 2008 ; Watzka et al, 2011
<b>Trp59Arg</b>	Résistance acénocoumarol, phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique, exon 2	Watzka et al, 2011
<b>Trp59Cys</b>	Résistance phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique, exon 2	Watzka et al, 2011
<b>Trp59Leu</b>	Résistance phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique, exon 2	Watzka et al, 2011
<b>Val66Met</b>	Résistance phenprocoumone, warfarine	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Bodin et al, 2005 ; Bodin et al, 2008
<b>Val66Met</b>	Résistance phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Watzka et al, 2011
<b>His68Tyr</b>	Résistance fluindone (warfarine controversée)	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique, exon 2	Osman et al, 2006
<b>Gly71Ala</b>	Résistance phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Watzka et al, 2011
<b>Asn77Ser</b>	Résistance phenprocoumone	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Watzka et al, 2011
<b>Asn77Tyr</b>	Résistance phenprocoumone, warfarine	1 <sup>ère</sup> boucle cytosolique	Watzka et al, 2011
<b>Ile123Asn</b>	Résistance phenprocoumone	2 <sup>ème</sup> boucle lumineuse	Watzka et al, 2011
<b>Leu128Arg</b>	Résistance warfarine, acénocoumarol, fluindione, phenprocoumone	TM3	Rost et al, 2004 ; Bodin et al, 2005 ; Bodin et al, 2008
<b>Tyr139His</b>	Résistance phenprocoumone	TM3	Watzka et al, 2011

Dans ce tableau, les positions des acides aminés sur la chaîne protéique sont déterminées à partir du modèle à trois hélices transmembranaires, issu de Garcia et Reitsma, 2008 (figure 9).

Finalement, les découvertes génétiques sur la maladie familiale de déficience multiple en facteur de coagulation ainsi que sur VKORC1 ont permis de développer des algorithmes informatiques calculant la dose d'AVK nécessaire pour qu'un individu atteigne un INR idéal. Ces formules prennent en compte le génotype des deux gènes ainsi que des données étiologiques, comme l'âge, le sexe, le poids et le régime alimentaire (Oldenburg et *al.*, 2008 ; Wallin et *al.*, 2008).

Cependant, le polymorphisme génétique du gène *VKORC1* a été étudié uniquement chez l'Homme et chez les rongeurs, mais très peu chez d'autres espèces animales. Ainsi, les travaux menés dans cette thèse expérimentale et reportés sur ce manuscrit avaient pour objectif d'étudier le polymorphisme du gène *VKORC1* dans l'espèce bovine, étude menée dans un contexte épidémiologique particulier présenté dans la partie suivante.



### III. Etude de *Ferula* sp. et rétrospective des cas d'intoxication recensés

#### III.a. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

La fêrule est une plante du genre *Ferula* appartenant à la famille des apiacées. Le genre *Ferula* ne compte pas moins de 130 espèces, s'étendant depuis l'ouest de l'Asie au sud de l'Europe, ainsi qu'à l'Afrique du Nord, et dans tout le bassin méditerranéen (Bonnier et Douin, 1990 ; Bonnier et Douin, 1998). Elle se présente sous la forme de plantes très robustes de plusieurs mètres de hauteur, sans poils. Sa floraison a lieu entre mai et juillet, selon les espèces (Bonnier et Douin, 1990 ; Bonnier et Douin, 1998).

Dans le sud de la France, quatre espèces sont répertoriées : *F. communis* L., *F. Communis Microcarpa*, *F. communis communis*, et *F. glauca* (Gault et al., 2019).

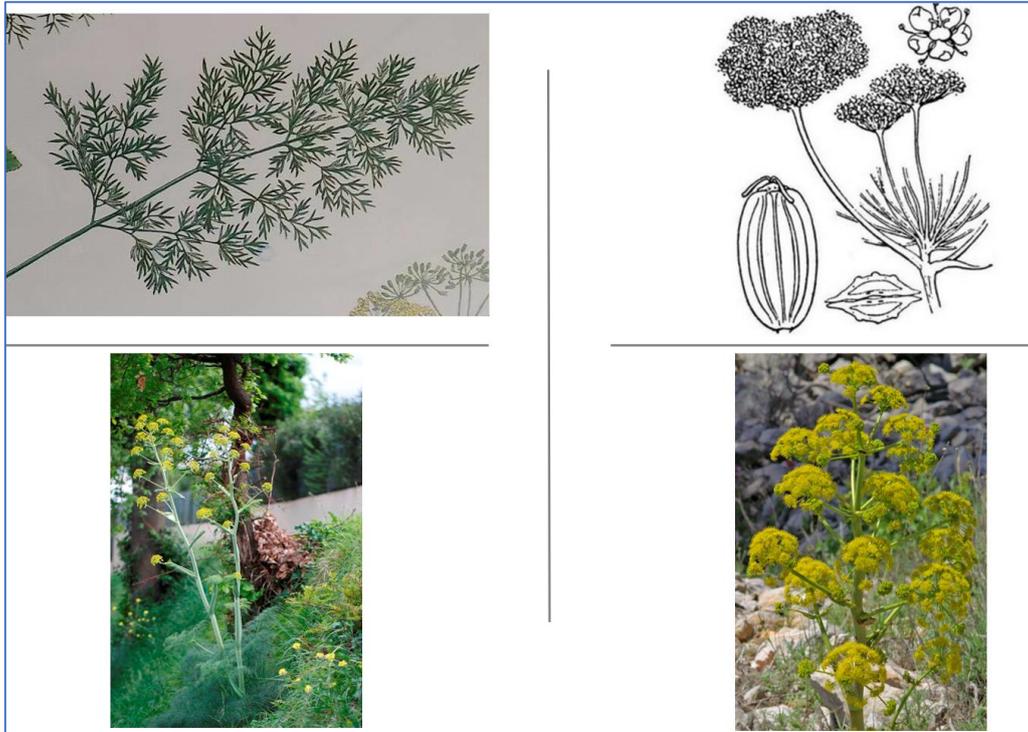
**Tableau 8** : Présentation des différentes espèces, sous-espèces et variétés de *Ferula* (d'après Gault et al, 2019)

Genus	Species	Suspecies	Varieties
Ferula	communis L.	communis	communis
		brevifolia	brevifolia
		genuia	
		catalaunica	catalaunica
		microcarpa	
	glauca L.		
	tingitana L.		
	arrigonii		

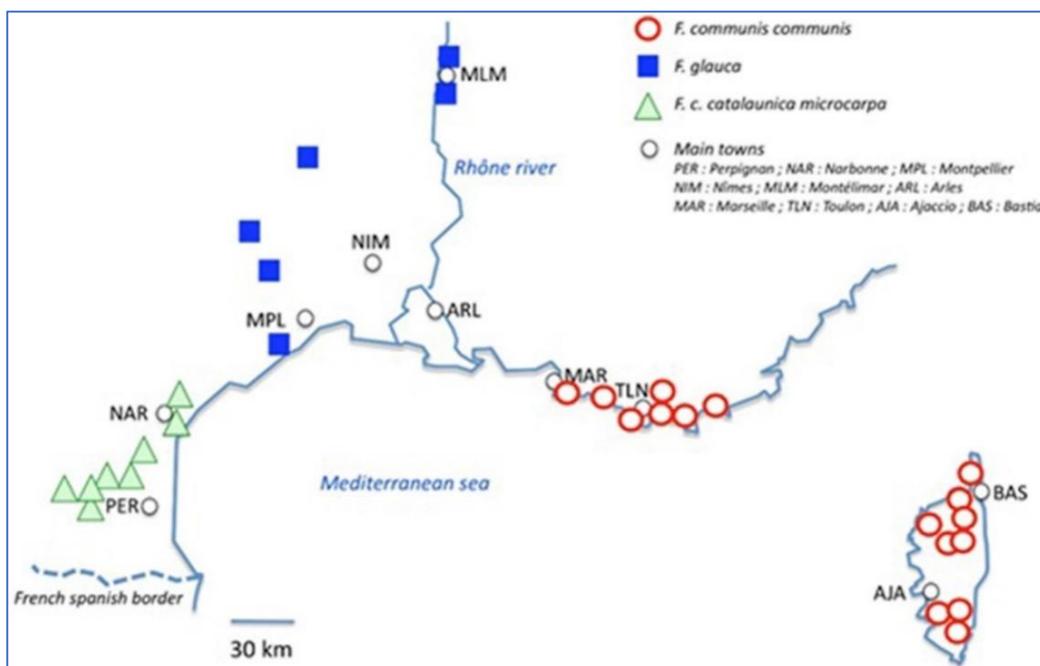
La fêrule est une plante vivace et robuste qui ne présente pas de poils. La fleur est de couleur jaune, elle possède des pétales entiers et pointus, découpés en lanières. Cependant, chacune des sous-espèces présente des caractéristiques morfo-anatomiques et écologiques qui lui sont propres (Figure 13) (Bonnier et Douin, 1990) :

- *Ferula communis* (appelée aussi *Ferula nodiflora* ou *Fêrule à fleurs nodales*) : elle peut mesurer entre 1m et 2m50, et est retrouvée dans les bois ou sur les coteaux des régions en bordures de mer (elle préfère les terrains calcaires, à moins de 400m d'altitude). Elle fleuri entre juillet et août. Les feuilles sont divisées en segments, la tige est striée de manière longitudinale mais creuse à l'intérieur. La fleur est composée de plusieurs ombelles : la plus grande en position centrale produit les fruits ; elle est entourée de plusieurs ombelles latérale stériles de taille moins importante.
- *Ferula glauca* (appelée aussi *Fêrule glauque*) : sur cette espèce, les feuilles sont charnues, brillante sur le dessus mais très glauques en dessous. Les feuilles sont plus larges avec des bords parallèles. Les fruits font environ 20mm de longueur. Cette espèce de fêrule reste assez rare.

Enfin, chacune de ces espèces présente une répartition géographique différente. Ainsi, *F. glauca* n'est retrouvée que dans le Languedoc et la *F. microcarpa* est présente dans l'est des Pyrénées-Orientales (Gault et *al.*, 2019). Ces deux espèces sont cependant absentes du territoire Corse : seule la *F. Communis* est présente en Corse ainsi que sur la côte méditerranéenne du Var (Figure 14).



**Figure 13** : Présentation de *F. glauca* (gauche) et *F. communis* (droite) (Bonnier et Douin, 1990)



**Figure 14** : Répartition géographique de *F. communis*, *F. glauca* et *F. microcarpa* (Gault et al, 2019)

Dans cette partie, nous avons vu que le genre *Ferula* rassemblait en fait de nombreuses sous-espèces réparties dans le monde entier. Cependant, certaines études ont montré que seulement quatre de ces espèces sont présentes en France, chacune présentant des caractéristiques morphologiques, anatomiques, écologiques et géographique qui lui sont propre. Cependant, d'autres travaux ont prouvé que ces espèces possèdent également des propriétés phytochimiques particulières responsables d'un syndrome hémorragique chez les mammifères, appelé férulose.

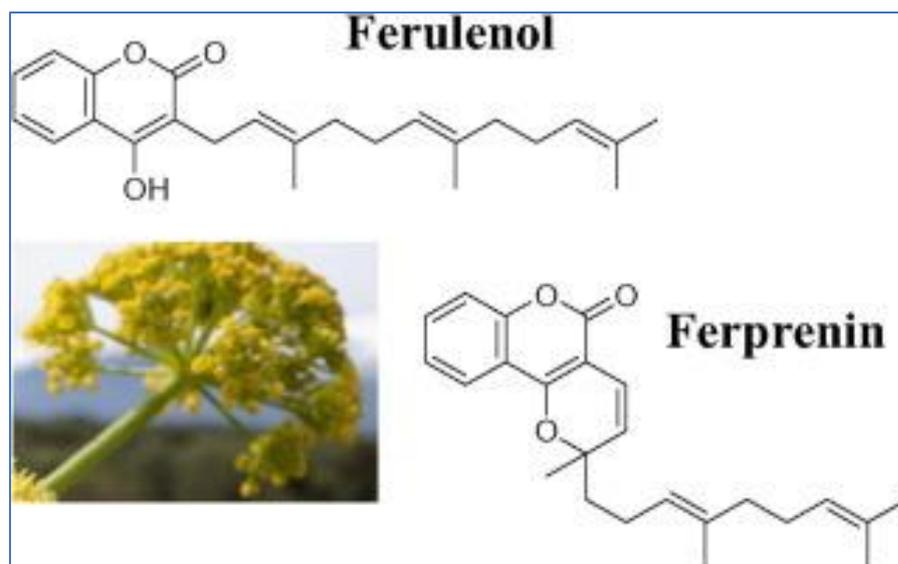
### **III.b. Composition chimique de la férule et mécanisme d'action du féruléol**

#### **III.b.1. Mise en évidence de la présence de composés coumariniques dans les différentes espèces de *Ferula sp.***

Depuis de nombreuses années, il a été rapporté que la consommation de *Ferula sp.* provoque un syndrome hémorragique dénommé « férulose », et souvent mortel en l'absence de traitement. Par exemple, en 2013, le centre de toxicologie de Lyon a diagnostiqué 28 cas d'intoxications à la férule dans différentes espèces (bovins, ovins, porcins et équins). D'autres études rapportent aussi qu'il existerait plusieurs chémotypes au sein de la même espèce, à savoir un chémotype dit « toxique » et un chémotype « non toxique » (Aragno et al., 1988 ; Monti et al., 2007). Cette différence serait due à la présence ou à l'absence de composés coumariniques dans la plante concernée.

C'est dans ce contexte qu'une étude visant à obtenir des données sur les teneurs en coumariniques de ces plantes fut menée (Gault et al., 2019). Pour ces travaux, de jeunes feuilles de *Ferula sp.* ont été cueillies dans plusieurs régions de France (Figure 14) et pays méditerranéens, ainsi qu'à différentes périodes de l'année (en début de croissance et au mois de juin). Ces mêmes feuilles ont par la suite été broyées, séchées puis stockées à l'abri de la lumière. Les composés coumariniques sont enfin extraits à partir de la matière sèche obtenue, puis identifiés par chromatographie.

Ces analyses ont permis de confirmer que seules quatre espèces de férule sont présentes en France (*F. communis L.*, *F. Communis Microcarpa*, *F. communis communis*, et *F. glauca L.*) et que les deux chémotypes « toxique et non toxique » sont liés à la teneur en composés coumariniques. Les deux molécules identifiées sont le « féruléol » et la « ferprénine » (Figure 15).



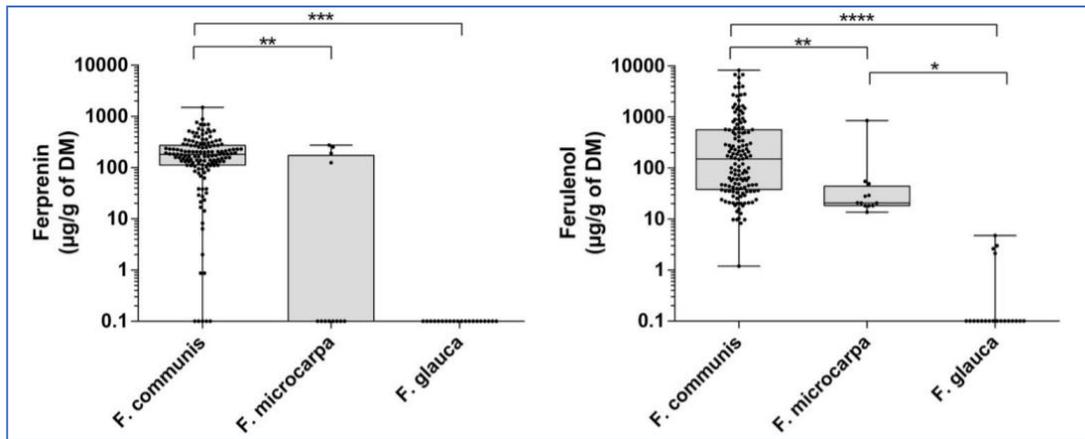
**Figure 15** : Présentation des deux molécules coumariniques présentes dans *Ferula* sp. (Louvet et al, 2015)

Ces deux molécules sont détectées dans toutes les variétés de férule, mais leurs teneurs sont différentes. En effet, elles sont également détectées dans les chémotypes non toxiques, mais en quantités trop faibles pour entraîner des troubles de la coagulation.

**Tableau 9** : Concentrations en féruléol et ferprénine de *Ferula communis communis* prélevées dans différents pays (d'après Gault et al., 2019)

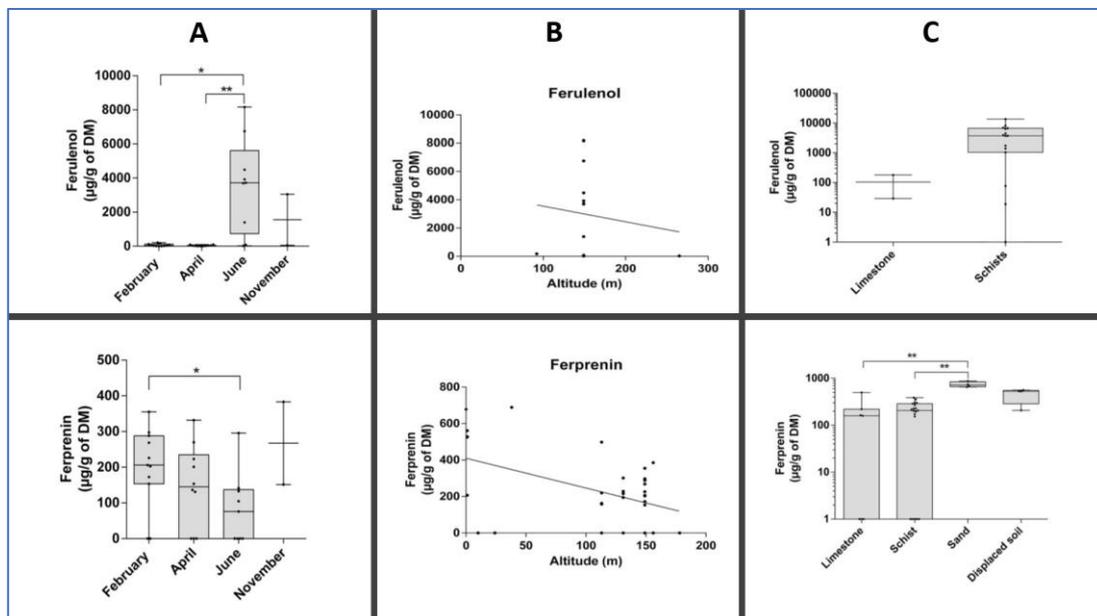
Provenance de l'échantillon	Nombre	Féruléol ( $\mu\text{g/g DM}$ )	Ferprénine ( $\mu\text{g/g DM}$ )
France continentale	140	149,7 (37,9 – 562,4)	181,8 (112,4 – 271,4)
Corse du sud	7	61,5 (34,9 – 853,3)	0 (0 – 16,2)
Corse du nord	20	29,4 (12,9 – 44,5)	49,8 (25,1 – 100,1)
Algérie	7	4853 (2461 – 7133)	75,7 (0 – 174,2)
Italie	3	5765 (3198 – 6488)	0 (0 – 402,4)
Portugal	3	6,5 (1,5 – 9,3)	0 (0 – 0)
Espagne	1	138,8	0
Tunisie	3	29,8 (4,5 – 32,1)	52,6 (3,9 – 76,9)

Le tableau 9 montre qu'il existe des variations de concentration au niveau continental, mais également au niveau mondial (Gault et al., 2019). De plus, en France continentale, les deux coumariniques sont en quantité très importante chez *Ferula communis communis* et *Ferula communis microcarpa*, alors qu'ils sont presque indétectable chez *Ferula glauca* (figure 16) (Gault et al., 2019).



**Figure 16** : Présentation des concentrations en féruléol et ferprénine en fonction de l'espèce de férule (Gault et al., 2019)

En ce qui concerne l'impact de l'environnement sur les teneurs en coumariniques des plantes, cette étude a montré que les teneurs en féruléol sont plus importantes en été qu'en hiver et au printemps, alors que la saison n'a aucun impact sur les teneurs en ferprénine. Pour le féruléol, ni l'altitude ni le type de sol n'ont d'impact sur sa teneur. En revanche, pour la ferprénine, les teneurs diminuent avec l'augmentation de l'altitude. Enfin, elles sont plus élevées sur un sol sableux que sur un sol calcaire (Gault et al., 2019).



**Figure 17** : Présentation des concentrations en féruléol et ferprénine en fonction de la saison (A), de l'altitude (B) et du type de sol (C) (Gault et al., 2019)

Finalement, cette étude a permis de confirmer que seules quatre espèces de fêrûle étaient présentes en France sur le pourtour méditerranéen et en Corse. L'environnement et le type de sol influent la croissance des différentes espèces de fêrûle ; toutes les espèces ne sont pas retrouvées dans toutes les zones géographiques. Concernant la phytochimie de la fêrûle, cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de deux composés coumariniques : le féruléol et la ferprénine, présents à des teneurs différentes en fonction de l'espèce, leur conférant alors un chémotype « toxique » ou « non toxique ». En effet, ces molécules sont responsables d'un syndrome se manifestant par des hémorragies, comme dans le cadre d'intoxication aux AVK de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> générations. Deux études datant de 2007 et 2015 ont analysé les mécanismes d'action de ces molécules.

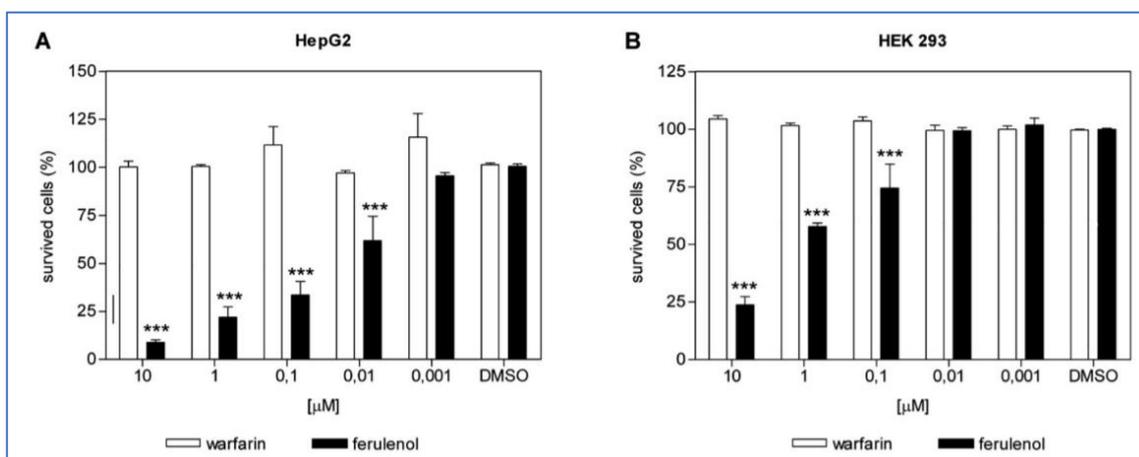
### **III.b.2. Le féruléol entraîne l'inhibition de VKORC1, altère la biosynthèse des facteurs de coagulation et présente une cytotoxicité hépatique**

Des cas d'intoxication à la fêrûle ont donc été signalés en méditerranée occidentale, en Sardaigne et au Maroc, notamment des cas d'hémorragies chez des Hommes et des bovins faisant suite à la consommation de fêrûle (cf III.c.). Le but des études suivantes était de comprendre le mécanisme d'action du féruléol, et de comparer sa toxicité aux molécules anti-coagulantes déjà connues et utilisées.

En 2007, l'équipe de Monti a isolé une série de composés prothrombotiques à partir de plants de *Ferula communis*. Dans un premier temps, l'équipe s'est concentrée sur les effets généraux du féruléol sur la cascade de coagulation, en réalisant des dosages de prothrombine plasmatique mélangée à différentes concentrations de féruléol. Même lorsque les concentrations en féruléol étaient très élevées, les valeurs de prothrombine restaient dans les valeurs usuelles et comparables à celles d'un pool de plasma normal. Ces résultats ont permis d'exclure un effet direct du féruléol sur la cascade de coagulation. Ensuite, des analyses ont été menées pour analyser l'effet du féruléol sur la survie et la multiplication cellulaire.

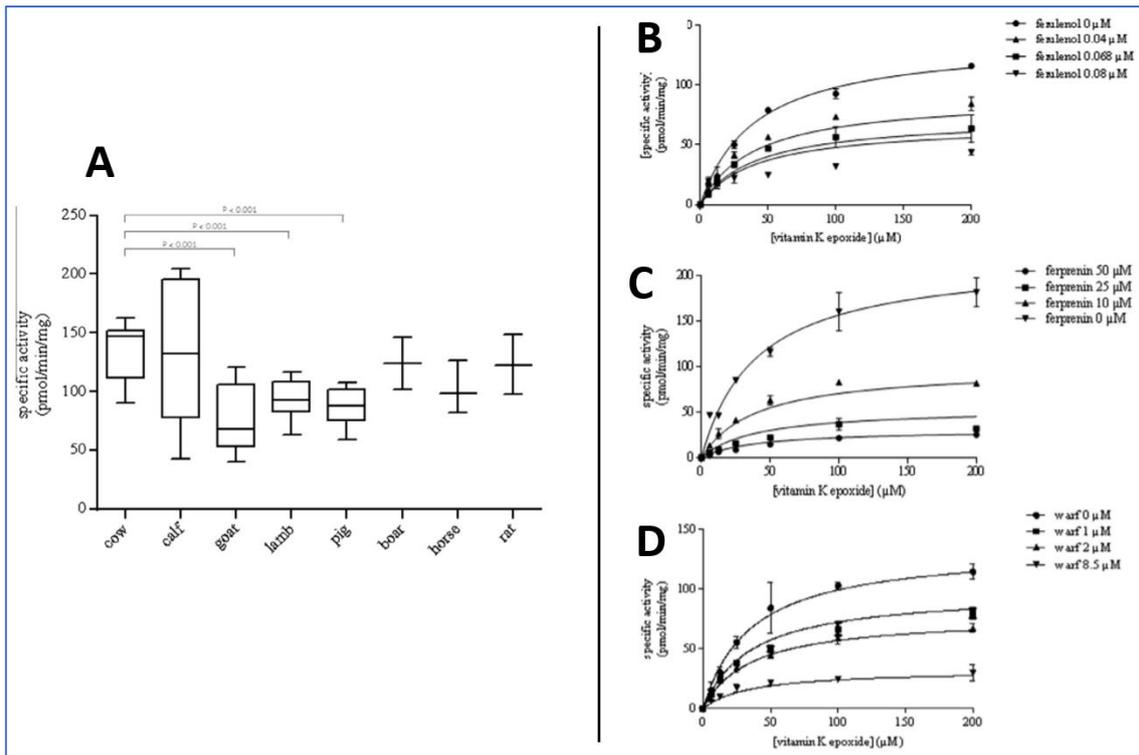
Pour cela, des lignées de cellules hépatiques et rénales humaines (qui interviennent dans la biosynthèse des facteurs de coagulation) ont été mises en présence de féruléol ou d'autres dérivés coumariniques. Les analyses ont montré que le féruléol, bien qu'il n'ait pas d'impact sur la multiplication cellulaire, présente une cytotoxicité, à des concentrations différentes selon la lignée cellulaire (toxique à 10 µM pour la lignée de cellules hépatiques, contre 10 nM pour la lignée de cellules rénales). Cette cytotoxicité s'expliquerait par une altération des microtubules et de la fonction mitochondriale par le féruléol (Bocca et al., 2002). La cytotoxicité du féruléol est plus importante que celle de la warfarine (Figure 18).

Finalement, cette étude expérimentale a montré que le féruléol n'interviendrait pas directement sur la cascade de coagulation, mais altérerait la biosynthèse des facteurs de coagulation grâce à sa cytotoxicité hépatique, et ce de manière plus importante que la warfarine. Ces résultats ont aidé à la compréhension au niveau moléculaire du syndrome hémorragique entraîné par la consommation de *Ferula sp.*



**Figure 18** : Comparaison de la survie des lignées cellulaires hépatiques (A : HepG2) et rénales (B : HEK 293) suite à leur exposition au féruléol ou à la warfarine (Monti et al., 2007)

Une seconde étude a été conduite en 2015, par l'équipe de Louvet. Le but de cette étude était de faire une étude comparative de l'action du féruléol, de la ferprénine et d'AVK connus, vis-à-vis du recyclage et de l'inhibition de la vitamine K chez différentes espèces. Dans un premier temps, l'activité de la vitamine K époxyde réductase (VitK-ER) de foies exposés à la férule a été déterminée, le but étant d'évaluer la capacité des hépatocytes à recycler la vitamine K malgré la présence de féruléol. Pour cela, des microsomes hépatiques de différentes espèces ont été préparés et l'activité de VKOR a été mesurée à des concentrations saturantes en VitK-ER. Bien que des différences d'activité statistiquement significatives aient été mises en évidence entre les espèces, tous les microsomes préparés ont montré leur capacité à réduire la VitK-ER (figure 19-A). Ensuite, l'inhibition du féruléol et de la ferprénine sur l'activité de la VitK-ER a été mesurée sur des microsomes de foie de veau, en comparant cette inhibition à celle de la warfarine. Ainsi, il a été montré que le féruléol était capable d'inhiber l'activité de VKOR, de manière non compétitive (figure 19-B). La ferprénine était également capable d'inhiber l'activité VKOR de manière non compétitive, mais à des concentrations bien plus élevée que le féruléol (figure 19-C). Les microsomes ont montré une résistance 100 fois supérieure à l'action de la ferprénine qu'à celle du féruléol.



**Figure 19** : Activité de la VitK-ER en présence de féruléol chez différentes espèces (A), et présentation de l'inhibition de VKOR de microsome de foie de veau en présence de féruléol (B), ferprénine (C) et warfarine (D) (Louvet et al., 2015)

Pour terminer, l'équipe de Louvet a évalué les différences d'inhibition sur VKORC1 du féruléol, de la ferprénine et de la warfarine sur des microsomes de foies de différentes espèces (tableau 10).

**Tableau 10** : Valeurs des  $K_i$  du féruléol, de la ferprénine et de la warfarine, déterminés dans des microsomes hépatiques de différentes espèces (d'après Louvet et al, 2015)

Espèce	$K_i$ du féruléol ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ de la ferprénine ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ de la warfarine ( $\mu\text{M}$ )
Bovin	0,13 +/- 0,06	16,6 +/- 1,2	2,3 +/- 0,4
Veau	0,04 +/- 0,01	5,2 +/- 1,4	2,5 +/- 0,1
Chèvre	0,04 +/- 0,02	2,8 +/- 1,4	1,6 +/- 1,3
Agneau	0,03 +/- 0,01	8,0 +/- 4,0	0,8 +/- 0,2
Porc	0,04 +/- 0,01	10,3 +/- 1,9	1,2 +/- 0,2
Sanglier	0,08 +/- 0,02	3,7 +/- 0,6	0,8 +/- 0,1
Cheval	0,04 +/- 0,01	16,3 +/- 2,1	1,3 +/- 0,3
Rat	0,03 +/- 0,01	1,9 +/- 0,4	0,5 +/- 0,1

Ces résultats ont montré qu'il existe des différences significatives de  $K_i$  entre les espèces, mais également entre les molécules étudiées. Pour le féruléol et la ferprénine, le  $K_i$  est plus élevé dans les microsomes de foie de bovin.

En conclusion, ces deux études ont permis de démontrer que le féruléol, et dans une moindre mesure la ferprénine, sont responsables du syndrome hémorragique se développant à la suite de la consommation de férule. Ces molécules anticoagulantes agissent d'une part sur la biosynthèse des facteurs de coagulation (directement au niveau des hépatocytes), mais également en inhibant l'activité de la protéine VKORC1. La toxicité de ces deux molécules dépend de la pharmacocinétique dans chaque espèce, mais l'effet hémorragique et l'inhibition de VKORC1 sont dus à la présence en continue de ces molécules. Ainsi, quelques heures sans cette inhibition sont suffisantes pour restaurer le pool de facteurs de coagulation et corriger le syndrome (Louvet et *al.*, 2015). La toxicité de tels composés dépend donc du mode d'administration : la digestion ruminale peut être assimilée à un apport continu en féruléol, même si la consommation en férule ne l'est pas.

### **III.c. Etat des lieux sur les utilisations du féruléol et présentation de cas d'intoxications à *Ferula sp.***

Au Maroc et dans d'autres pays du Maghreb, deux variétés de férule (*F. brevifolia* et *F. genuina*) servent à la production de gomme et de savon extraits à partir des racines, ils sont ensuite utilisés en médecine traditionnelle (Lamnouer et *al.*, 1999). En effet, certaines communautés utilisent la poudre de racines séchées de ces plantes mélangée à du miel comme substance aphrodisiaque, ou encore pour ses propriétés anti-allergiques et anti-VIH (Derin et *al.*, 2013). Enfin, les jeunes tiges de férule sont également intégrées dans l'alimentation de certaines communautés. Cependant, ces modes d'utilisation ont fait l'objet de nombreuses intoxication au féruléol chez plusieurs espèces.

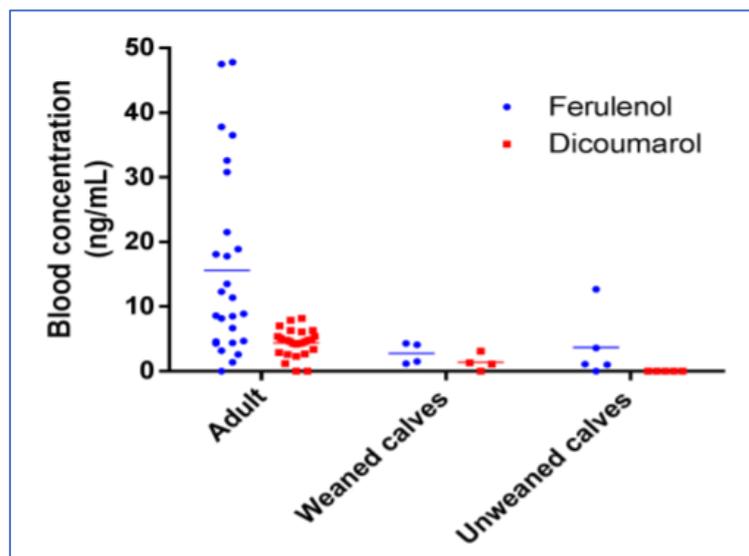
Les doses toxiques et les délais d'apparition des signes cliniques développés lors d'intoxications au féruléol ont été étudiés en laboratoire chez les rongeurs, chez les ovins et chez les caprins. En 2002, des souris ont été traitées avec du féruléol dans le but de déterminer sa DL50 et de la comparer à celle de la warfarine. Cette étude a permis de montrer que la DL50 du féruléol était comprise entre 100 et 319 mg/kg, ce qui est supérieur à la DL50 de la warfarine. Les signes cliniques sont les mêmes que ceux décrits dans le syndrome de férulose, et les mâles semblent plus sensibles que les femelles à cette molécule (Fraigui et *al.*, 2002). En 1994, l'équipe de Tligui a distribué de la poudre de *Ferula communis* à des groupes d'ovins, à raison de 2,5 mg/kg/j pendant 15 jours. Le féruléol a été détecté dans le plasma des sujets dès 6h après ingestion de la poudre, et les animaux présentaient des signes classiques d'intoxication dès le deuxième jour. Tous les temps de coagulation se sont cependant normalisés 4 jours après arrêt d'exposition au féruléol (Tligui et *al.*, 1994). Une autre étude a permis de montrer que les temps de coagulation ont nettement augmenté et les signes cliniques sont apparus à partir d'une dose de 2,5 à 5mg/kg/ jour de féruléol (Shlosberg et Egyed, 1985). Enfin, une étude sur l'intoxication des chèvres a été réalisée en Tunisie (Lahmar et *al.*, 2018).

Au cours de cette étude, des chèvres ont été exposées de manière volontaire au féruléol (pâturage dans des champs de *Ferula communis*). Une semaine après le début de l'exposition, elles ont présenté des signes cliniques d'intoxication, pouvant aller jusqu'à la mort surtout chez les plus jeunes animaux.

De nombreux cas d'intoxications accidentelles ont été répertoriés chez de nombreuses espèces, ainsi que chez l'Homme. En effet, en 2013, une mère et son enfant ont été emmenés aux urgences suite à la consommation de fêrulle (usage thérapeutique), car tous deux présentent des signes de férulose. Les signes cliniques se sont normalisés après un traitement par fluidothérapie (Derin *et al.*, 2013). De 1990 à 2012 le Centre National de Toxicologie Vétérinaire de Lyon a diagnostiqué 28 cas cliniques d'intoxications à la fêrulle chez des bovins, ovins, porcins et équins. De tous ces cas rapportés, nous en retiendrons quatre, qui illustrent des cas d'intoxications chez différentes espèces (Gault *et al.*, 2013) :

- Le premier cas a concerné un troupeau de vaches de race Aubrac, élevées en Corse : quatre vaches ont été retrouvées mortes au pré. L'examen nécropsique et les examens complémentaires ont montré la présence de féruléol dans le foie, confirmant que les animaux sont morts d'un syndrome hémorragique généralisé. Enfin, une analyse de la pâture a montré une grande quantité de *Ferula communis*, et a confirmé que les plantes avaient été broutées.
- A un autre endroit de l'île, un éleveur d'ovins a rapporté que quatre brebis laitières sont mortes subitement dans son élevage. La pâture contenait également des pieds de *Ferula communis*. Les brebis mortes ont été autopsiées, et présentaient un syndrome hémorragique généralisé (muqueuses pâles et hémorragies intestinale et vésicale). A l'examen clinique, la moitié du troupeau présentait une faiblesse générale, avec une baisse d'appétit et des muqueuses pâles. L'analyse sanguine a montré également une augmentation des temps de coagulation, compatible avec une intoxication aux AVK. Ainsi, après avoir retiré le troupeau de cette pâture, tous les animaux ont été traités avec de la vitamine K1. Néanmoins trois autres brebis sont mortes le premier jour. Tous les temps de coagulation sont revenus aux valeurs de référence en 4 jours.
- Le troisième cas concernait un lot de 80 porcs élevés en liberté dans les collines pour engraissement. Après trois mois de vie en extérieur, tout le fourrage disponible a été consommé, et cinq porcs ont été retrouvés morts. A l'autopsie, ils présentaient également un syndrome hémorragique généralisé, les analyses hépatiques ont révélé la présence de féruléol dans l'organisme. L'examen clinique des animaux a montré que plusieurs animaux étaient faibles et présentaient des muqueuses pâles. L'analyse de la zone de pâture a montré que des pieds et des racines de *Ferula communis* ont été mangés.
- Enfin, le quatrième cas concernait trois chevaux en pâture, qui commençaient à présenter des signes de faiblesse et des muqueuses pâles après une sécheresse de quatre mois. Une intoxication aux AVK ayant été suspectée, tous les chevaux ont été traités avec de la vitamine K1. Ce traitement a permis de les soigner, ce qui a permis de confirmer le diagnostic d'intoxication.

Finalement, les cas d'intoxication au féruléol, qu'ils soient volontaires ou accidentels, sont assez nombreux et touchent un grand nombre d'espèces, y compris l'Homme. Tous les sujets présentent des signes d'hémorragie généralisée, ainsi que des temps de coagulation augmentés et des taux de facteurs de coagulation diminués. Ce syndrome, s'il est découvert trop tard, peut conduire à la mort des animaux touchés. En 2020, une autre étude de l'impact du féruléol sur les bovins a été menée (Gault et *al.*, 2017). Cette étude s'est focalisé sur des bovins de race Corse d'âges différents et exposés au féruléol (élevage en plein air). Cette étude a confirmé que les bovins adultes et sevrés consomment réellement des plants de férule, puisque des taux assez hauts de féruléol ont été mesurés dans le plasma (figure 20). Dans cette étude, l'origine du dicoumarol est encore indéterminée.



**Figure 20** : Concentrations sanguine en féruléol et dicoumarol chez des bovins corses adultes, sevrés et non sevrés (Gault et *al.*, 2017)

Cette étude a montré également que le féruléol est une molécule excrétée dans le lait. Ce phénomène était déjà suspecté chez l'Homme (Derin et *al.*, 2013). Cependant, malgré une exposition certaine au féruléol des bovins de race Corse, aucun des sujets intégrés à cette étude ne présentaient de signes cliniques compatibles avec le phénomène de férulose.



*PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE*

Etude du polymorphisme du  
gène *VKORC1* chez les bovins  
(*Bos taurus*)

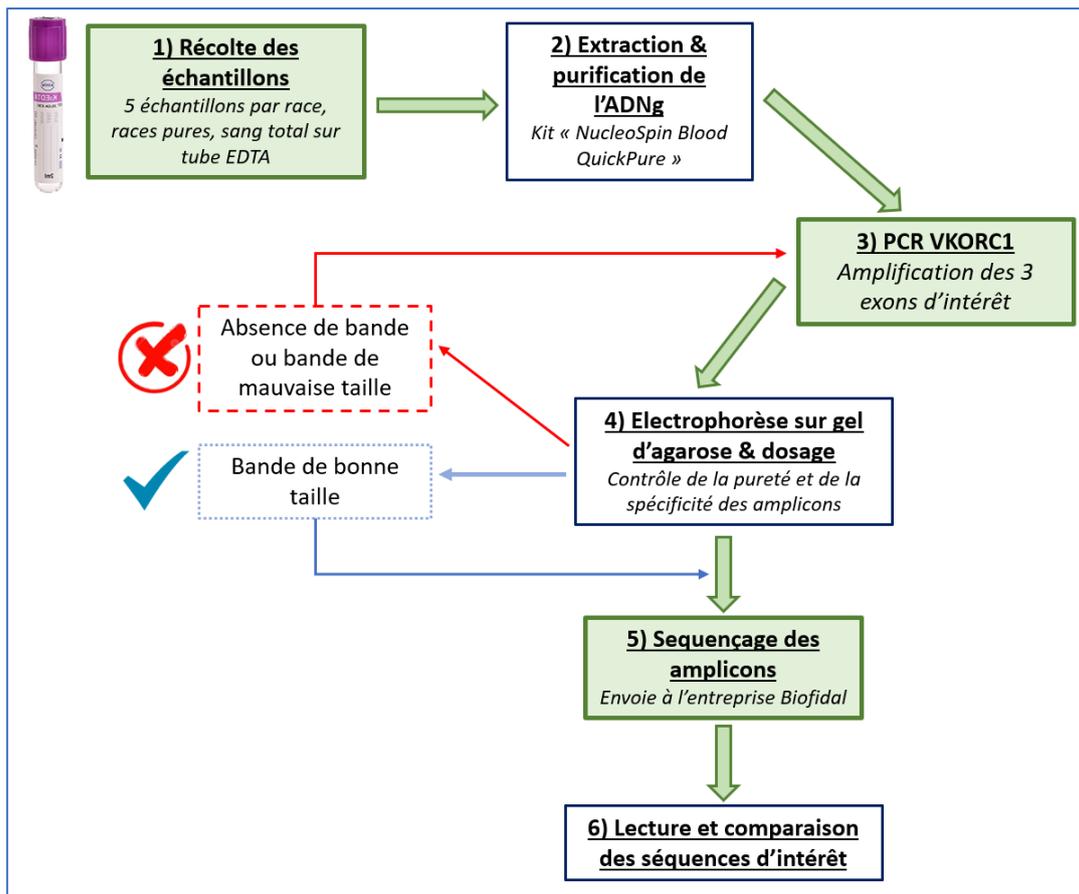


## Introduction

Le polymorphisme du gène *VKORC1* a essentiellement été étudié chez l'Homme, le chat et certaines espèces de rongeurs. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, ce gène code pour la protéine *VKORC1* qui intervient dans le recyclage de la vitamine K et donc dans le processus de coagulation. Nous avons notamment rapporté que certains problèmes de coagulation recensés chez les vertébrés peuvent être soit consécutifs à la consommation (volontaire ou intoxication) de molécules anti-vitamine K, ou à des mutations génétiques (exemple : maladie familiale de déficience multiple des facteurs de coagulation). Cependant, d'autres mutations génétiques également localisées sur le gène *VKORC1* peuvent conférer aux Hommes ou aux animaux une résistance aux molécules anti-coagulantes. Un certain nombre de ces mutations ont été répertoriées et étudiées.

En Corse et sur le pourtour méditerranéen, plusieurs cas d'intoxications à la férule ont été répertoriés dans diverses espèces (bovins, porcins, petits ruminants, chevaux, Homme). En effet, cette plante de la famille des apiacées est très riche en féruléol, molécule de la famille des coumariniques, et connue pour provoquer un syndrome hémorragique pouvant entraîner la mort. Cependant, les études conduites ont montré que les bovins de race corse, malgré leur consommation annuelle de férule, ne présenteraient pas ce syndrome (Gault et *al.*, 2017) à l'inverse de bovins d'autres races (Gault et *al.*, 2013).

Ainsi, dans ce travail expérimental de thèse, nous avons formulé l'hypothèse de l'existence, chez les bovins de race corse, de mutations génétiques conférant une hyposensibilité au féruléol. Un protocole expérimental (figure 21) a été établi afin d'étudier le polymorphisme du gène *VKORC1* chez les bovins, et de vérifier si cette résistance au féruléol avait une origine génétique. Des échantillons de sang de différentes races de vaches (dont des vaches corses) ont été récoltés, puis la séquence du gène *VKORC1* a été amplifiée à partir de ces échantillons et les produits PCR ont été séquencés. Enfin, nous avons comparé les séquences *VKORC1* des vaches corses avec celles d'autres races bovines et d'autres espèces.



**Figure 21** : Stratégie opératoire de l'étude (Albistur A.)

## I. Matériel et méthode

Ce projet expérimental, enregistré sous le numéro 1943, a bénéficié d'un avis favorable délivré par le comité d'éthique de VetAgro Sup - Campus vétérinaire de Lyon. L'attestation d'avis favorable est présentée en annexe 1.

### I.a. Animaux

Les échantillons sanguins de cette étude ont été récoltés à l'occasion de plusieurs campagnes de prélèvement, réalisés dans différents départements de France, ainsi qu'en Corse. Ces campagnes ont permis d'obtenir au total de 61 échantillons de sang issus de 10 races de vaches différentes.

- Les échantillons de sang des bovins Corses ont été récoltés en septembre 2018. Ils ont aussi été utilisés pour la mise en place du protocole d'amplification du gène *VKORC1* bovin réalisé en amont.
- La deuxième campagne est issue des départements de la Loire (42) et de l'Ain (01), ainsi que du troupeau pédagogique de VetAgro Sup (69) : quatre échantillons de races charolaise, six de Prim'Holstein, sept de Montbéliarde, deux de Limousine, deux de Salers et un d'Aubrac.
- La troisième campagne de prélèvements a été menée dans le département du Tarn (81) : trois échantillons de Limousine, un de Charolaise, cinq de Gasconne, quatre d'Aubrac, cinq de Salers et cinq de Blonde d'Aquitaine.
- Enfin, la dernière campagne de prélèvement a été réalisée dans le département de Haute-Savoie (74) : elle a permis la récolte de dix échantillons de race Abondance.

Tous les prélèvements ont été réalisés de manière aléatoire, sur des bovins de race pure, sans conditions de sexe, d'âge ou d'exposition à un anticoagulant dans l'environnement. Au total, 61 vaches ont été intégrées dans l'étude : six Corses, dix Abondances, cinq Aubracs, cinq Blondes d'Aquitaine, cinq Charolaises, cinq Gasconnes, cinq Limousines, sept Montbéliardes, six Prim'Holsteins et sept Salers. La liste de tous les sujets de l'étude est présentée en annexe 2.

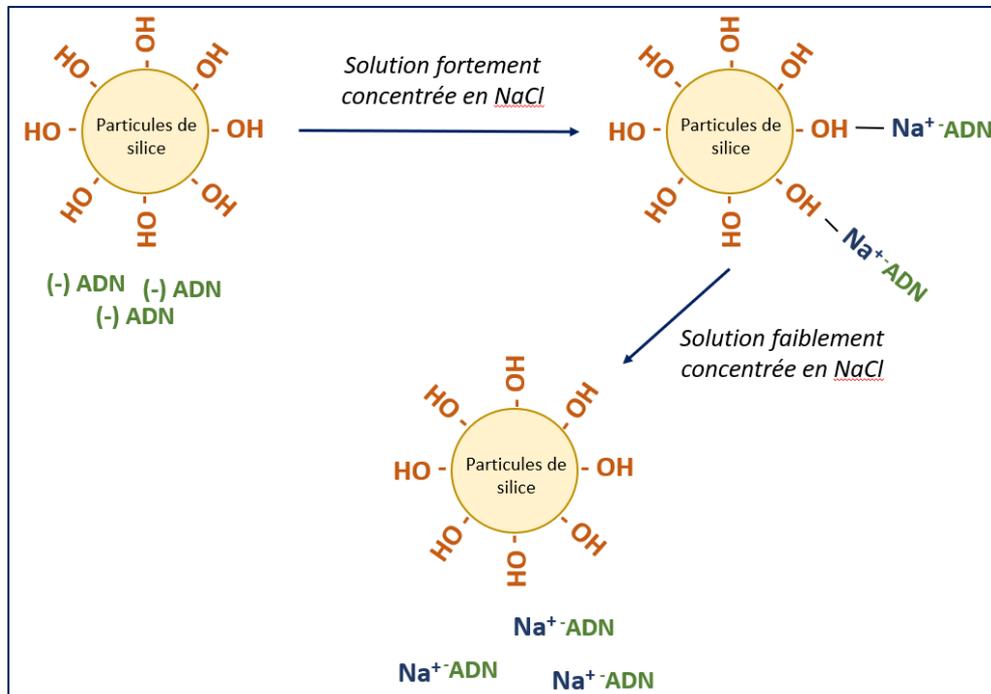
### I.b. Extraction de l'ADN génomique

L'objectif de cette étape est d'isoler la molécule d'ADN à partir des cellules sanguines. Pour cela, l'ADN génomique a été extrait à partir 200µL de sang total prélevés sur tube EDTA, grâce au kit « NucleoSpin Blood QuickPure ». L'ADN extrait a été soumis aux manipulations présentées dans la stratégie opératoire (figure 21).

L'extraction se divise en quatre étapes principales :

- Lyse des tissus, hydrolyse des protéines sanguines et précipitation de l'ADN
- Fixation spécifique des acides nucléiques sur une colonne de silice
- Lavage pour éliminer les différents constituants cellulaires
- Éluion de l'ADN

Le principe repose sur une chromatographie d'adsorption sur colonne de silice (figure 22), elle fixe spécifiquement l'ADN sur la silice en milieu salin concentré. L'ADN est ensuite élué et isolé grâce à de l'eau (ou à une solution saline très faiblement concentrée).

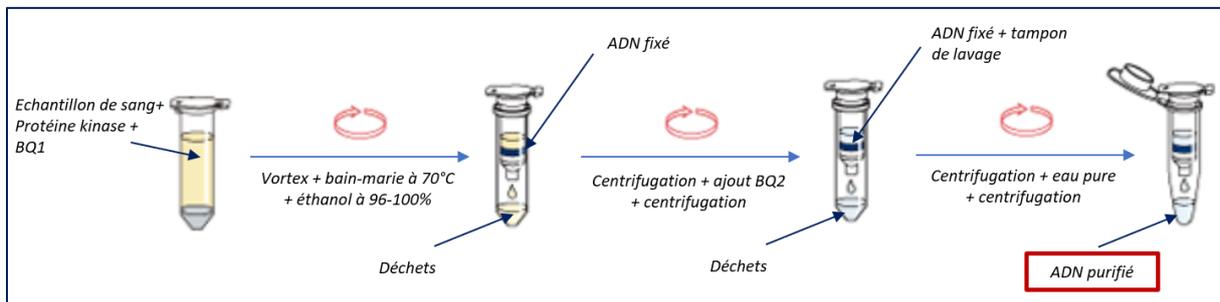


**Figure 22 :** Principe de la chromatographie d'adsorption sur colonne de silice (Albistur A.)

Le kit « NucleoSpin Blood QuickPure », de chez Macherey Nagel, a été utilisé pour cette étape (figure 23) en respectant le protocole d'utilisation du fournisseur détaillé en annexe 3. Pour cela, nous avons utilisé le matériel suivant :

- Des colonnes de silice (fournies par le kit) : les groupements « -OH » présents sur les particules de silice permettent la formation de liaisons hydrogènes avec les ions Na<sup>+</sup> contenus dans la solution saline. Ils jouent le rôle de « pont » entre les particules de silice et les molécules d'ADN. Ainsi, l'ADN est fixé spécifiquement dans un milieu à force ionique élevée avec un pH <7. Les impuretés sont éliminées par des lavages, et l'ADN est élué dans une solution à faible force ionique à pH >7.
- La protéinase K et le détergent (fournis par le kit) : permettent la lyse des cellules sanguines, ainsi que la dégradation des protéines présentes dans le milieu.
- Les tampons BQ1 et BQ2 (fournis par le kit) : ce sont des tampons de lavage, ils permettent l'élimination des différents constituants cellulaire, tout en conservant l'ADN adsorbé à la silice de la colonne. En effet, ces macromolécules sont précipitées sélectivement par diminution de pH (insolubles en pH acide), puis éliminées par centrifugation.
- Tampon d'éluion (eau ultrapure) : permet de diminuer la force ionique et l'augmentation du pH du milieu, ce qui permet l'éluion de l'ADN.

- Ethanol à 96-100% : il est ajouté dans le tampons BQ2, permet la précipitation de l'ADN, et assure le maintien des conditions optimales pour la fixation de l'ADN.

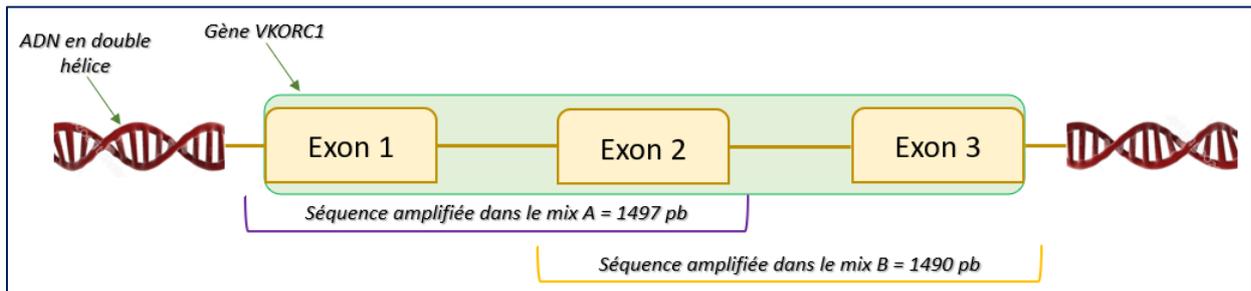


**Figure 23** : Protocole d'extraction d'ADN sur colonne de silice (Albistur A.)

### I.c. Amplification par PCR de la séquence du gène VKORC1

L'objectif de cette étape était d'amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction) la séquence nucléotidique de l'ensemble du gène *VKORC1* chez les bovins (*Bos taurus*). La totalité de la séquence de *bovVKORC1* (2177pb, 3 exons) a été amplifiée par deux réactions indépendantes permettant d'obtenir deux produits partiellement chevauchants (figure 24). Ainsi, deux couples d'amorces ont été utilisés :

- « Mix A » : permet d'amplifier les exons 1 et 2.
- « Mix B » : permet d'amplifier les exons 2 et 3.



**Figure 24** : Schéma d'amplification du gène *VKORC1* en deux PCR chevauchante (Albistur A.)

Le mode opératoire utilisé est présenté en annexe 4. Chacune des deux réactions PCR a permis d'amplifier un fragment d'ADN à partir du couple d'amorces spécifiques (mix A ou mix B), de tampon, de dNTP et de Taq polymérase.

Chaque mix de PCR avait la composition suivante :

- Eau ultrapure : elle sert de diluant,
- Taq polymérase™ Accuprime (Invitrogen) : c'est une enzyme thermorésistante, permettant l'élongation des brins d'ADN pendant les cycles PCR,
- Tampon II (10X) : il est spécifiquement utilisé avec l'®Accuprime et permet de maintenir le pH du milieu au niveau optimum pour activer et favoriser l'action de la Taq Polymérase,
- Les amorces spécifiques : séquence d'ADN simple brin d'environ 20 nucléotides, qui fonctionnent par couple (tableau 11). Dans cette étude, deux mix différents ont été utilisés pour amplifier la totalité de la séquence du gène VKORC1 (mix A et mix B,)
- dNTP : mélange équimolaire des quatre nucléotides (A = Adénine, T = Thymine, C = Cytosine et G = Guanine),
- Echantillons : produits d'extraction.

**Tableau 11** : Couples d'amorces utilisés pour la PCR (Albistur A.)

Couple	Nom des amorces	Séquence	Taille amplicon
<b>MIX A</b>	BosVKR-A-F (sens)	5' AGC-GGG-CGT-GGT-CAA-ATC 3'	1497 pb
	BosVKR-A-R (anti-sens)	5' CTC-AGT-GAT-GCG-CAG-TTA-GTT-G 3'	
<b>MIX B</b>	BosVKR-B-F (sens)	5' GGA-GAT-TTA-AGG-GTC-CAA-GGC-A 3'	1490 pb
	BosVKR-B-R (anti-sens)	5' GTA-GCA-AAC-TGT-GGC-ATG-TCT-G 3'	

La synthèse d'ADN a été réalisée dans un thermocycleur, programmé selon les étapes suivantes (figure 25 et annexe 4) :

- Activation de la Taq Polymérase – 94°C pendant 3 minutes
- La dénaturation de l'ADN – 94°C pendant 20 secondes : les deux brins d'ADN sont séparés par coupure des liaisons hydrogène.
- L'hybridation des amorces – 60°C pendant 20 secondes : fixation des amorces complémentaires à la séquence d'intérêt.
- L'élongation des brins – 68°C pendant 90 secondes : la Taq Polymérase permet la synthèse du nouveau brin d'ADN par complémentarité.
- Fin d'élongation – 68°C pendant 10 minutes
- Maintien des échantillons à 10°C

Le cycle « dénaturation – hybridation – élongation » a été répété 40 fois. Ce protocole PCR, spécifique pour l'amplification du gène VKORC1 chez *Bos taurus*, a été mis en place en amont de cette étude.

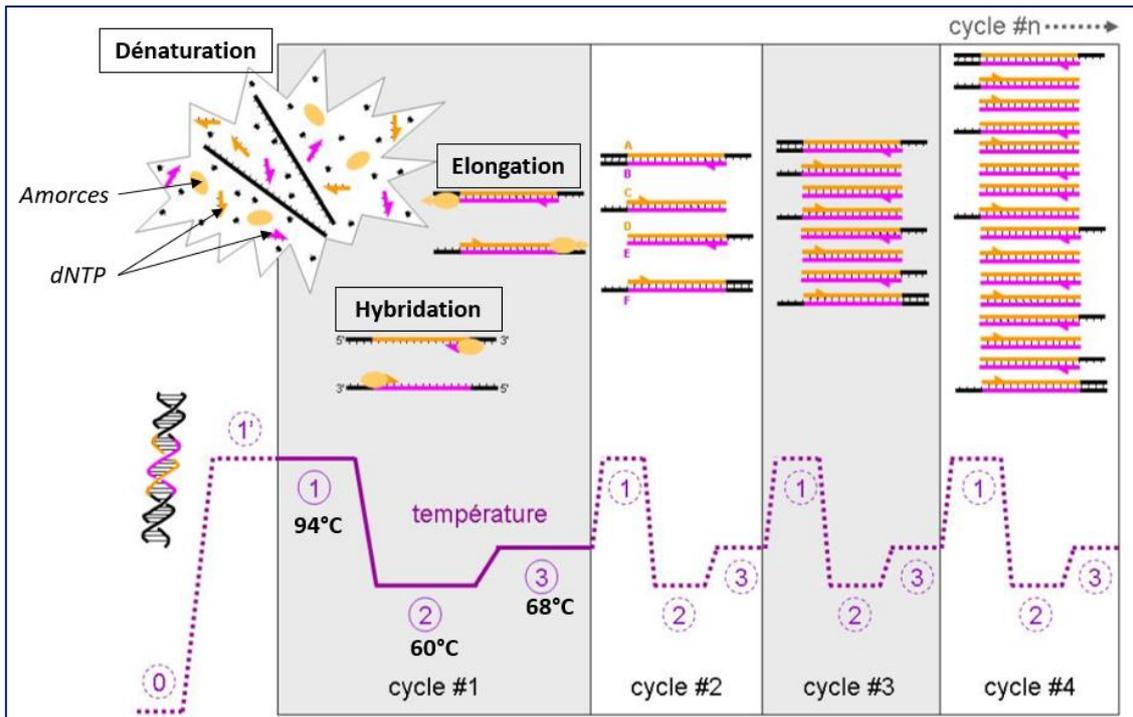


Figure 25 : Principe de la PCR (Pruvot, 2009)

## I.d. Contrôle de la PCR : électrophorèse sur gel d'agarose

Cette étape permet de vérifier non seulement la spécificité des séquences amplifiées, mais aussi la pureté des produits obtenus, avant leur envoi au séquençage. Pour cela, nous avons suivi le protocole détaillé en annexe 5.

### I.d.1. Électrophorèse sur gel d'agarose

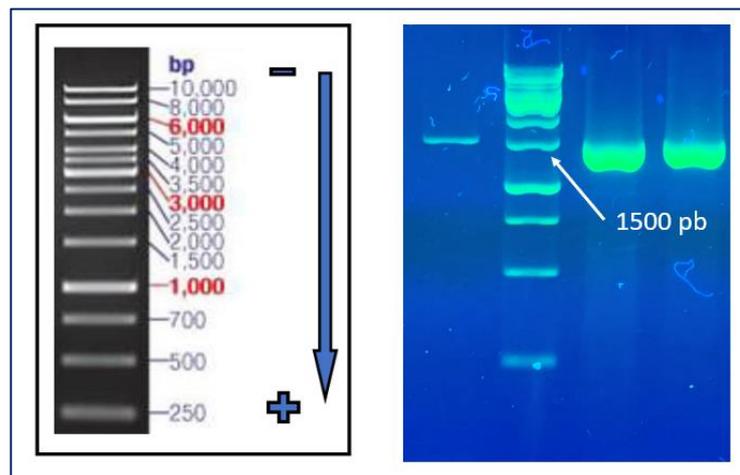
L'objectif de l'électrophorèse en gel d'agarose est de confirmer l'amplification spécifique des amplicons de chaque échantillon (séquence de 1497 et 1490pb ; figure 24), en comparant leurs tailles avec celles de molécules d'un marqueur de poids moléculaire étalon (*DNA ladder* = mélange de molécules de tailles connues). Cela consiste à faire migrer les produits issus de la réaction PCR sur un gel d'agarose, concentré à 1,5%. Cette concentration est optimale pour des molécules d'ADN entre 200 et 3000pb.

L'ADN est une molécule chargée négativement (grâce à la présence de groupements phosphates). Ainsi, quand elle est soumise à un courant électrique, elle se déplace vers l'anode du dispositif. La molécule migre plus ou moins facilement en fonction de sa taille : plus une molécule est de petite taille, plus elle sera proche de l'anode à la fin de la migration.

Cette étape nécessite plusieurs composants :

- L'agarose : c'est un polysaccharide purifié extrait de l'agar électriquement neutre.
- Le tampon TBE (0,5X) : le tampon Tris Borate EDTA (toxique pour le manipulateur).
- DNA loading dye : c'est une solution concentrée colorée de forte densité. Elle est composée de glycérol, qui permet de densifier l'échantillon et d'entraîner l'ADN au fond du puits, et de trois colorants (orange G, bleu de bromophénol et xylène cyanol) utilisés en qualité de marqueurs de mobilité. A l'issue de l'électrophorèse, on peut distinguer trois bandes de différentes couleurs : bande orange (migration équivalente à un produit de 50 pb), une bande bleu violet (migration équivalente à un produit équivalent de 300 pb) et une bande bleu turquoise (migration équivalente à un produit de 4000 pb),
- DNA ladder : c'est un marqueur de poids moléculaire, une solution qui contient un mélange de molécules d'ADN de tailles différentes et connues. Par comparaison, il sert à estimer la taille des échantillons PCR amplifiés (figure 26).

Les gels d'agarose à 1,5% préparés dans une solution de TBE 0,5X additionnée de colorant safeView, ont été soumis à un courant électrique de 100 volts pendant 30 à 40 minutes, dans une cuve à électrophorèse. La visualisation des bandes de migration se fait sous UV grâce à la présence du colorant de l'ADN (safeView).



**Figure 26** : DNA Ladder (marqueur de poids moléculaire) utilisé pour l'étude (Albistur A.)

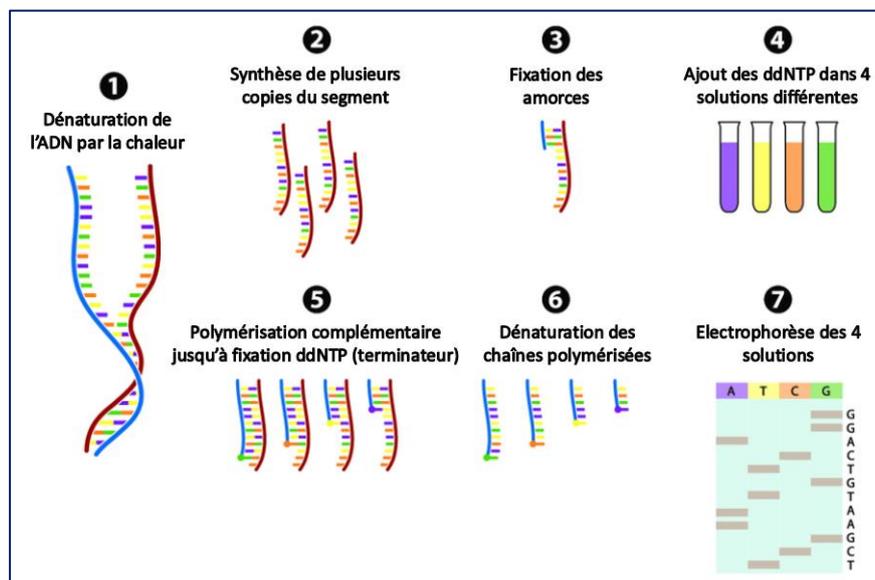
### **I.d.2. Contrôle de pureté = dosage A260 nm/ A280 nm**

L'objectif de cette étape était de vérifier le degré de pureté des produits de PCR.

Les acides nucléiques présentent un maximum d'absorbance (A) de la lumière à une longueur d'onde de 260nm (grâce à leur bases azotées), alors que les protéines ont une absorbance maximale à 280nm grâce aux acides aminés aromatiques, surtout le tryptophane. Un spectrophotomètre permet de mesurer l'absorbance dans l'ultra-violet. Le rapport A260/A280 de chaque échantillon permet d'évaluer son degré de pureté. Les absorbances sont mesurées contre un blanc (eau ultrapure). Le rapport A260/A280 doit être compris entre 1,8 et 2 pour que l'échantillon soit jugé suffisamment pur.

## I.e. Séquençage des amplicons

Pour le séquençage selon la méthode Sanger (figure 27), chaque échantillon est mélangé avec l'amorce spécifique conçue pour son séquençage, une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase 5'→3', les quatre dNTP, ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) marqué de manière fluorescente. Les ddNTP, à la différence des dNTP, ne possèdent pas d'extrémité 3'-OH, mais seulement un hydrogène à la place du groupement hydroxyle. Ainsi, l'incorporation de l'un des ddNTP au cours de l'élongation d'une molécule entraîne l'arrêt de l'étape de synthèse de cette molécule (terminaison de chaîne). Enfin, les molécules polymérisées sont analysées par électrophorèse hautement résolutive.



*Figure 27 : Schéma du séquençage par la méthode Sanger (Biofidal)*

Les échantillons ainsi que les amorces de séquençage (tableau 12), ont été adressés à l'entreprise Biofidal (Vaux en Velin, France) pour un séquençage selon la méthode Sanger (figure 27).

*Tableau 12 : Amorces utilisées pour le séquençage (Albistur A.)*

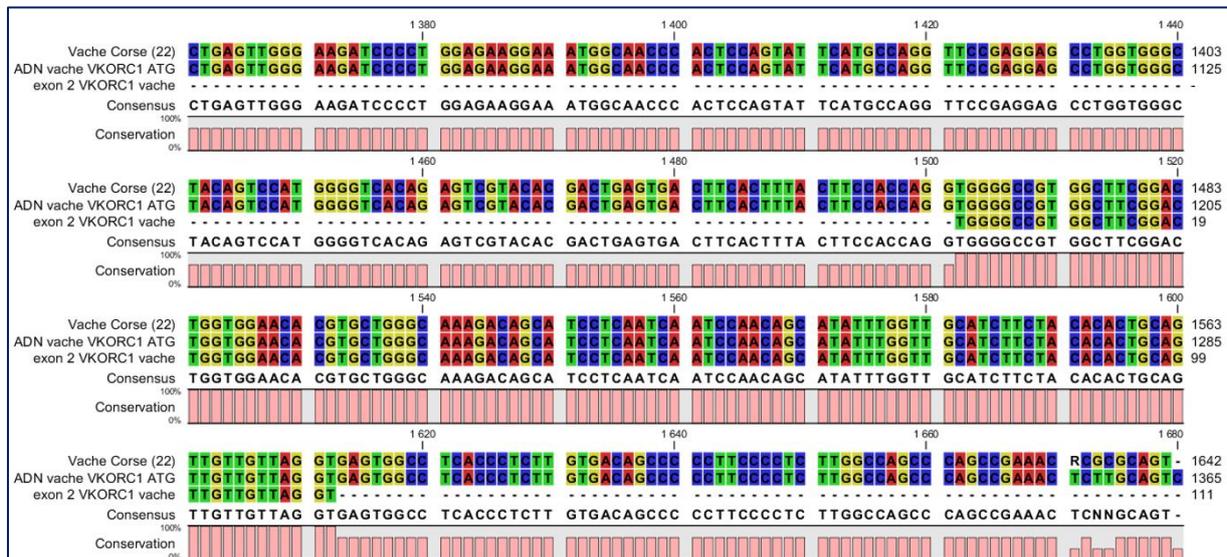
Nom des amorces	Séquence	Exon visé
<b>BosVKR-A-F</b>	5' AGC-GGG-CGT-GGT-CAA-ATC 3'	Exon 1
<b>BosVKR-A-R</b>	5' CTC-AGT-GAT-GCG-CAG-TTA-GTT-G 3'	Exon 2
<b>BosVKR-B-R</b>	5' GTA-GCA-AAC-TGT-GGC-ATG-TCT-G 3'	Exon 3

Un volume minimum de 2 µl de chaque échantillon à séquencer accompagné de l'amorce spécifique pour le séquençage et concentrée à 10 µM (10 pmoles/µl) ont été adressées à Biofidal. La réaction de séquençage nécessite un ADN très pur. Ainsi, chaque échantillon était accompagné des résultats du dosage A260/A280 ainsi que de la photo de la migration de l'amplicon sur gel d'agarose.

## I.f. Lecture et comparaison des séquences amplifiées

Les séquences obtenues (fichiers et électrophorégrammes adressés par Biofidal) ont été lues par le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor, puis analysées et comparées avec la séquence de référence *bovVKORC1* (NCBI Reference Sequence: NM\_001003903.3) grâce au logiciel CLC Sequence Viewer7 (figure 28). L'objectif de cette étape consistait à détecter d'éventuelles mutations sur les 3 exons de *VKORC1*, en comparant les résultats du séquençage avec la séquence « de référence » de *VKORC1* de la même espèce (*Bos taurus*).

Le logiciel CLC séquence viewer a permis d'aligner et de comparer les différentes séquences, et donc de détecter les variations nucléotidiques (SNP *Single Nucleotide Polymorphism*) de la séquence codante ainsi que leur position.



**Figure 28 :** Exemple d'alignement de la séquence d'un échantillon de vache corse par rapport à la séquence de référence à l'aide du logiciel CLC Sequence Viewer

### Légende :

- Ligne 1 « vache corse 22 » = séquence de l'échantillon 22 adressé par Biofidal
- Ligne 2 « ADN vache VKORC1 ATG » = séquence de la totalité du gène VKORC1 de l'espèce étudiée *Bos Taurus* NCBI Reference Sequence: NM\_001003903.3
- Ligne 3 « exon 2 VKORC1 vache » = séquence de l'exon 2 de VKORC1, issue de la banque de données NCBI Reference Sequence: NM\_001003903.3

## **I.g. Alignement des séquences protéiques de VKORC1 et prédiction de l'effet des variants SNP**

Pour aligner les séquences protéiques et prédire l'effet des variants SNP trouvés, nous avons utilisé trois logiciels en ligne :

- Le logiciel MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>) permet d'aligner les séquences protéiques VKORC1 de plusieurs espèces sélectionnées au préalable sur le site NCBI GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).
- Le logiciel MUTPRED2 (<http://mutpred2.mutdb.org/index.html>) permet de prédire l'effet d'un variant protéique en le comparant avec toutes les séquences et variations déjà existantes sur cette même protéine chez d'autres espèces.
- Le logiciel PROVEAN **PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer)** (<http://provean.jcvi.org/index.php>) : cet outil logiciel prédit si une substitution d'acide aminé ou un indel (insertion ou délétion) a un impact (effet neutre ou délétère) sur la fonction biologique d'une protéine.

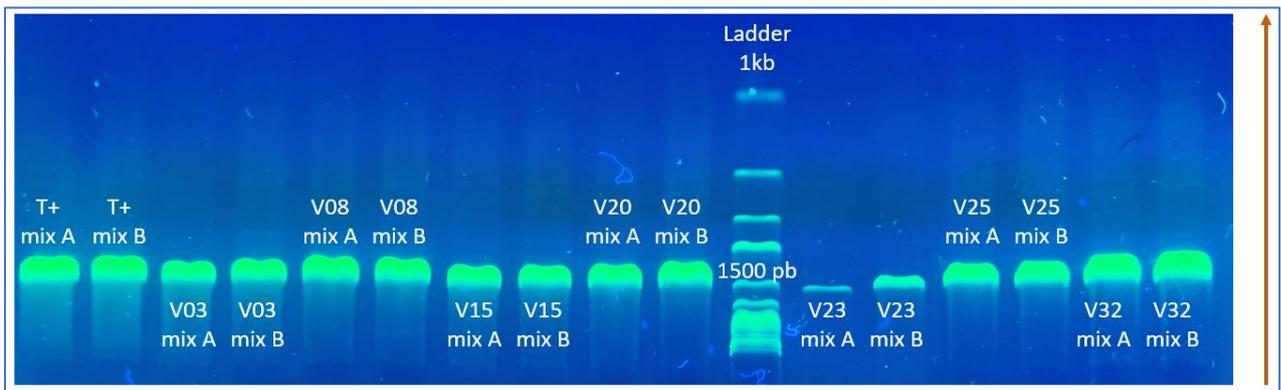


## II. Résultats

### II.a. Extraction de l'ADN génomique et amplification du gène *VKORC1*

Après extraction, les 61 échantillons d'ADN ont été amplifiés. Tous les produits de PCR ont présenté un rapport A280/A260 compris entre 1,8 et 2.

A l'issue de l'amplification, chaque produit de PCR contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose a montré la présence d'une seule bande à environ 1500pb. Un exemple de résultat d'électrophorèse est illustré dans la figure 29.



**Figure 29** : Résultats d'amplification d'ADN génomique *VKORC1* après révélation par électrophorèse sur gel d'agarose (Albistur A.)

*Légende = T+ : témoin ; Ladder : marqueur de poids moléculaire ; V03/V08/V15/V20/V23/V25/V32 : échantillons contrôlés. La flèche représente le sens de migration des échantillons sur le gel, après avoir été soumis à un courant électrique (de la cathode vers l'anode).*

En conclusion, l'ADN de chacun des 61 échantillons a été extrait et a pu être amplifié avec succès. Chaque produit PCR a été obtenu en quantité suffisante et avec un degré de pureté satisfaisant afin d'être adressé à l'entreprise Biofidal pour le séquençage nucléotidique selon la méthode de Sanger.

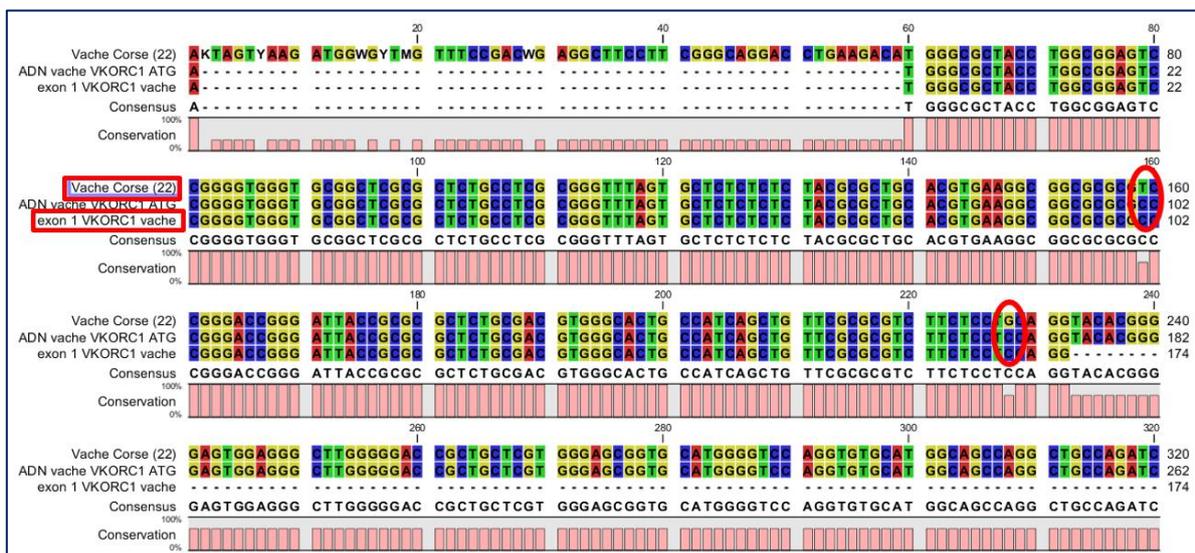
### II.b. Alignement des produits PCR avec la séquence d'intérêt

Les résultats obtenus lors de l'alignement des séquences établies avec la séquence de référence *bovVKORC1* (NCBI Reference Sequence: NM\_001003903.3) indiquent que :

- Quatre vaches de race Corse (Vc22, Vc25, Vc26 et Vc27) ainsi qu'un taureau de race Limousine (Vf14) présentent un SNP (mutation non silencieuse), en position 101 de l'exon 1 (c.101C>T), mutation présente à l'état homozygote,

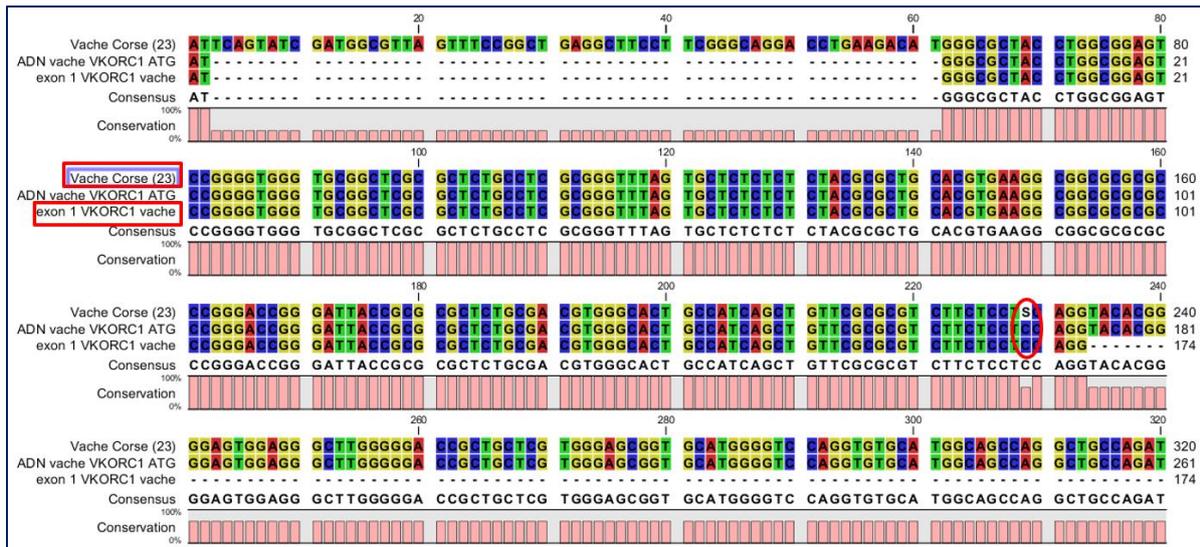
- Six vaches de race Corse (Vc22, Vc23, Vc24, Vc25, Vc26 et Vc27) ainsi que le taureau de race Limousine (Vf14) présentent un SNP (mutation non silencieuse), en position 170 de l'exon 1 (c.101C>T), présent à l'état homozygote ou hétérozygote, ainsi qu'un SNP (mutation silencieuse) dans l'exon 3 (c1857 C>G) présent à l'état homozygote,
- Aucun des autres bovins de l'étude, issus de neuf races différentes, ne présente de mutation dans l'un des 3 exons de VKORC1 par rapport à la séquence de référence *bovVKORC1*.

A titre d'illustration, les séquences des variants génétiques observés chez les vaches corses numéro 22 et 23 (Vc22 et Vc23) sont présentés dans les figures 30, 31, 32 et 33.



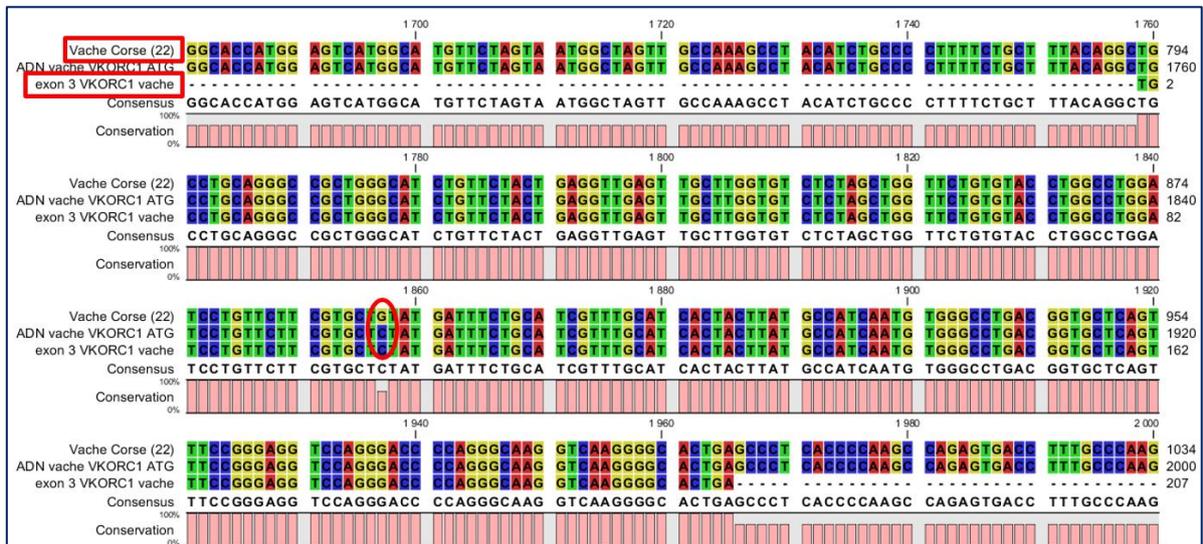
**Figure 30** : Alignement de la séquence de l'exon 1 de la Vc22 [Vache Corse (22)] par rapport à la séquence de référence NM\_001003903.3 (ADN vache VKORC1 ATG).

Deux mutations nucléotidiques non silencieuses (entourées en rouge) sont détectées en positions 101 et 170, ces SNP (c.101C>T et c.170C>G) sont présents à l'état homozygote. En raison de l'ordre d'alignement des séquences avec le CLC Sequence Viewer7, la numérotation nucléotidique de la séquence VC22 montre un décalage de 58 nucléotides par rapport à la position nucléotidique « normalisée » au codon ATG de la séquence de référence qui devrait être en position 1 : ainsi le nucléotide 101 apparaît en position 159 et le nucléotide 170 apparaît en position 228.

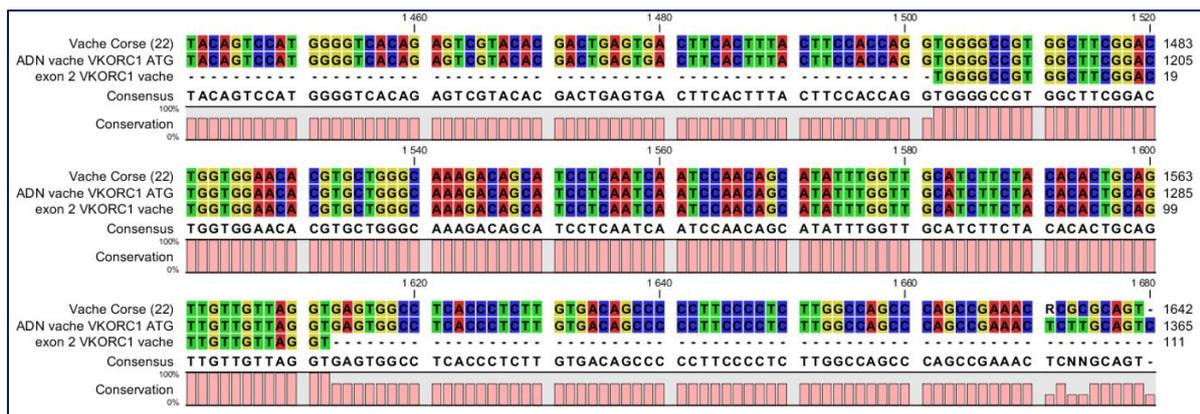


**Figure 31** : Alignement de la séquence de l'exon 1 de la Vc23 [Vache Corse (23)] par rapport à la séquence de référence NM\_001003903.3 (ADN vache VKORC1 ATG).

Une seule mutation nucléotidique non silencieuse (c.170C>G entourée en rouge) est détectée en position 170. Le SNP est présent à l'état hétérozygote : la lettre « S » correspond à un G ou à un C. En raison de l'ordre d'alignement des séquences avec le CLC Sequence Viewer7, la numérotation nucléotidique de la séquence Vc23 montre un décalage de 59 nucléotides par rapport à la position nucléotidique « normalisée » au codon ATG de la séquence de référence qui devrait être en position 1 : ainsi le nucléotide 170 apparaît en position 229.



**Figure 32** : Alignement de la séquence de l'exon 2 de la Vc22 [Vache Corse (22)] par rapport à la séquence de référence NM\_001003903.3 (ADN vache VKORC1 ATG) = absence de mutation



**Figure 33** : Alignement de la séquence de l'exon 3 de la Vc22 [Vache Corse (22)] par rapport à la séquence de référence NM\_001003903.3 (ADN vache VKORC1 ATG)

Une seule mutation nucléotidique silencieuse (c.1857C>G entourée en rouge) est détectée en position 1857. Le SNP est présent à l'état homozygote.

Ce sont les mêmes mutations qui ont été identifiées chez les vaches de race corse (Vc), et chez un taureau de race limousine (Vf14). Le tableau 13 présente toutes les mutations identifiées chez les 61 individus analysés. Le tableau de traduction des codons de nucléotides en acides aminés est présenté en annexe 6.

Chez les individus Vc22, Vc25, Vc26, Vc27 et Vf14, deux variants SNP sont retrouvés sur la séquence nucléotidique de l'exon 1 :

- En position 101 de la séquence nucléotidique, la cytosine est remplacée par une thymine (c.101C>T). Cette mutation faux-sens entraîne une modification de la chaîne protéique en position 34, où l'arginine initialement présente est remplacée par une valine (p.A34V).
- En position 170 de la séquence nucléotidique, la cytosine est remplacée par une guanine (c.170C>G). Cette mutation faux-sens entraîne une modification de la chaîne protéique en position 57, où la sérine est remplacée par une cystéine (p.S57C).

Ainsi, ces individus présentent deux mutations (à l'état homozygote) sur l'exon 1 du gène VKORC1, aux positions 101 et 170, entraînant deux modifications d'acides aminés sur la chaîne protéique.

Chez les individus Vc23 et Vc24, une mutation faux-sens est retrouvée à l'état hétérozygote en position 170 de la séquence nucléotidique (c.170C>S) : la cytosine est remplacée par une guanine sur l'un des deux allèles du gène VKORC1, et elle n'est pas substituée sur l'autre allèle. Par conséquent, deux chaînes protéiques peuvent coexister chez ces individus : l'une est modifiée en position 57 avec une sérine remplacée par une cystéine (p.S57C), et l'autre est de « type sauvage » avec une sérine en position 57 (p.S57).

Un dernier variant SNP, présent à l'état homozygote, a également été retrouvé en position 1857 de l'exon 3 chez tous les individus Vaches corses (Vc22 à Vc27) et chez le taureau de race Limousine (Vf14). Il s'agit d'une substitution nucléotidique où la cytosine est remplacée par une guanine (c.1857C>G). Au niveau protéique, cette mutation nucléotidique est silencieuse : elle n'entraîne pas de changement d'acide aminé(L127) puisque les codons « CUC » et « CUG » codent tous deux une leucine (annexe 5).

**Tableau 13** : Mutations nucléotidiques et protéiques identifiées dans les échantillons

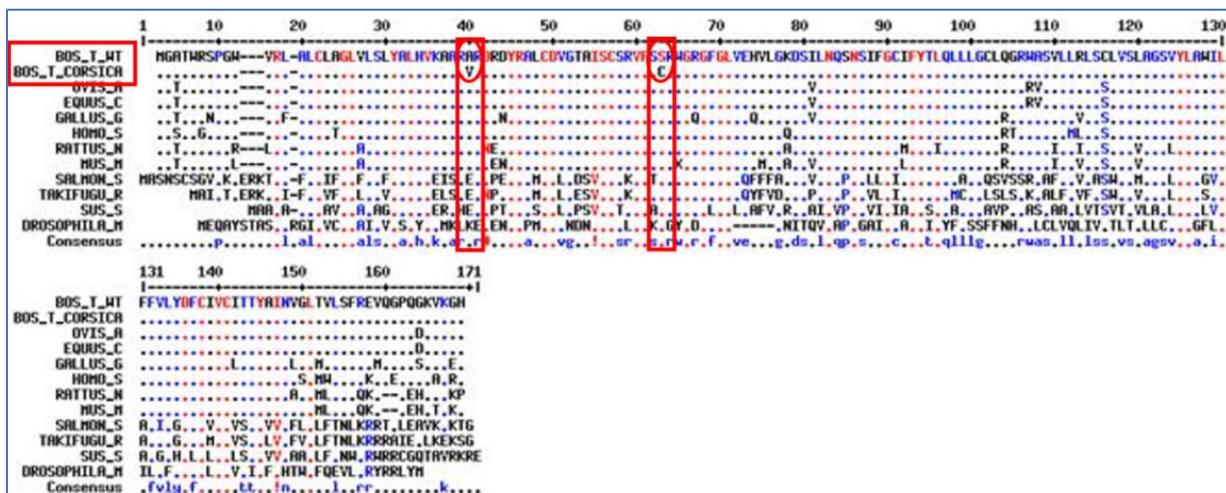
Séq	Exon 1		Exon 2		Exon 3	
	Nucléotidique	Protéique	Nucléo	Prot	Nucléotidique	Protéique
Vc22	c.101C>T homozygote	p.Ala34Val	RAS	RAS	c.1857C>G homozygote	p.Leu127*
	c.170C>G homozygote	p.Ser57Cys				
Vc23	c.170C>S hétérozygote	p.Ser57Cys	RAS	RAS	c.1857C>G homozygote	p.Leu127*
Vc24	c.170C>S hétérozygote	p.Ser57Cys	RAS	RAS	c.1857C>G homozygote	p.Leu127*
Vc25	c.101C>T homozygote	p.Ala34Val	RAS	RAS	c.1857C>G homozygote	p.Leu127*
	c.170C>G homozygote	p.Ser57Cys				
Vc26	c.101C>T homozygote	p.Ala34Val	RAS	RAS	c.1857C>G homozygote	p.Leu127*
	c.170C>G homozygote	p.Ser57Cys				
Vc27	c.101C>T homozygote	p.Ala34Val	RAS	RAS	c.1857C>G homozygote	p.Leu127*
	c.170C>G homozygote	p.Ser57Cys				
Vf14	c.101C>T homozygote	p.Ala34Val	RAS	RAS	c.1857C>G homozygote	p.Leu127*
	c.170C>G homozygote	p.Ser57Cys				

Légende : Vc = Vache corse ; Vf = Vache de métropole. La liste des abréviations des acides aminés est présentée en annexe 6.

## II.c. Alignement des séquences protéiques de VKORC1 et prédiction de l'effet des variants SNP

Les deux variants SNP découverts dans l'exon 1, et plus particulièrement les mutations qu'ils engendrent au niveau protéique, ont été soumis à trois logiciels disponibles en ligne afin de réaliser un alignement des séquences protéiques de différentes espèces et de prédire l'effet des deux mutations identifiées dans l'exon1 de *VKORC1*.

La séquence protéique *VKORC1* du bovin de race Corse a été alignée avec celle du bovin (*Bos taurus*), ainsi qu'avec dix autres espèces (figure 34). Le résultat de l'alignement avec Multalin montre que l'alanine (A) en position 34 est effectivement remplacée par une valine (V) chez le bovin de race Corse, mais également par un acide glutamique (E) chez le saumon, le fugu, le porc et la drosophile. En revanche, la sérine (S) présente en position 57 est remplacée par une cystéine (C) uniquement chez le bovin de race Corse.



**Figure 34 :** Alignement des séquences protéiques de *VKORC1* de plusieurs espèces, issu du logiciel Multalin (Albistur A.)

*Légende :* *Bos\_T\_HT* = *Bos taurus*, séquence bovine sauvage ; *Bos\_T\_Corsica* = Bovin corse ; *Ovis\_A* = ovin ; *Equus\_C* = cheval ; *Gallus\_G* = poule ; *Homo\_S* = Homme ; *Rattus\_M* = Rat ; *Mus\_M* = Souris ; *Salmon\_S* = Saumon ; *Takifugu\_R* = Fugu ; *Sus\_S* = Porc ; *Drosophila\_M* = Drosophile. Toutes les séquences protéiques ont été extraites du site NCBI GeneBank.

La présence de point signifie que l'acide aminé est conservé par rapport à la séquence de référence de l'alignement (ici = la séquence sauvage du bovin *Bos taurus*). Seuls les acides aminés modifiés sont représentés par le code à une lettre. Les deux mutations protéiques identifiées chez les bovins de race Corse (*Bos T CORSICA*) sont entourées en rouge ; ces mutations ne sont pas répertoriées chez les autres espèces de cet alignement. La taille des séquences protéiques de *VKORC1* varie en fonction des espèces et la numérotation des séquences s'en trouve décalée. Ainsi, l'acide aminé numéroté 40 sur cette représentation est en réalité l'acide aminé en position 34 chez le bovin ; De même, l'acide aminé numéroté 63 est celui en position 57.

Avec le logiciel MUTPRED2, chaque mutation est soumise à l'analyse indépendamment. Le logiciel communique un résultat assorti d'une valeur dénommée « MutPred2 score ». il s'agit d'un score général qui représente la probabilité que la modification de l'acide aminé soit pathogène ou non (une valeur du score supérieure à 0,50 suggère une pathogénicité).

- Pour la substitution p.Ala34Val (figure 35), le score obtenu est de 0,254 : ainsi, la substitution n'est pas considérée comme importante, c'est-à-dire qu'il ne semble pas que ce soit une mutation significative vis-à-vis de la propriété biologique de la protéine VKORC1.
- En revanche, pour la substitution p.Ser57Cys (figure 36), le score obtenu est de 0,507 : cette valeur indique que cette substitution pourrait être significativement impliquée dans la modification des propriétés biologiques de la protéine VKORC1. Le logiciel propose deux conséquences possibles : la perte d'un site d'ADP ribosylation sur le résidu arginine en position 53 (R53) (avec  $p_{\text{value}}=0,03$ ) et/ou une altération de la protéine transmembranaire (avec  $p_{\text{value}}=0,05$ ).

ID	Substitution	MutPred2 score	Remarks	Affected PROSITE and ELM Motifs
BOS	A34V	0.254	Predicted conservation scores	-

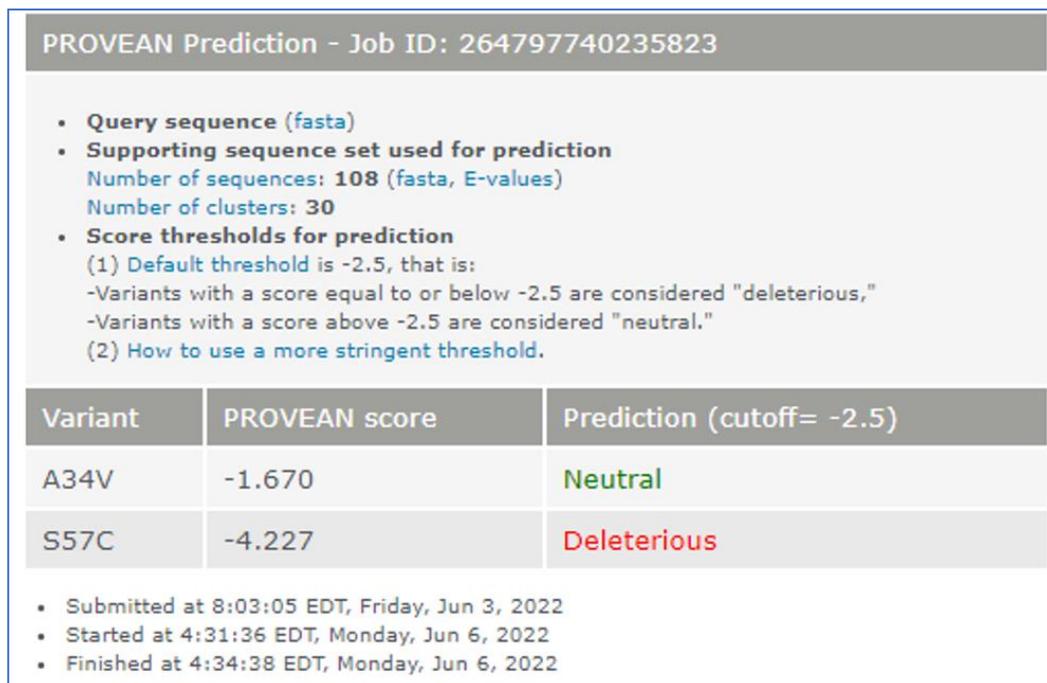
**Figure 35** : Prédiction de l'effet du variant p.A34V avec le logiciel Mutpred (Albistur A.)

ID	Substitution	MutPred2 score	Remarks	Affected PROSITE and ELM Motifs
BOS	S57C	0.507	Predicted conservation scores	<a href="#">ELME000162</a> , ELME000173, ELME000328, PS00005
Molecular mechanisms with P-values <= 0.05			Probability	P-value
Loss of ADP-ribosylation at R53			0.21	0.03
Altered Transmembrane protein			0.10	0.05

**Figure 36** : Prédiction de l'effet du variant p.S57C de VKORC1 avec le logiciel Mutpred (Albistur A.)

Légende : la mutation p.S57C a été considérée comme non neutre car son score MuPred2 est supérieur à 0.5. L'impact de la mutation peut entraîner la perte d'un site d'ADP ribosylation sur le résidu arginine en position 53 (R53) (avec une pvalue de 0,03) et/ou une altération de la protéine transmembranaire (avec une pvalue de 0,05).

Enfin en complément des analyses précédentes, l'utilisation du logiciel PROVEAN a permis de prédire si chacune des deux substitutions d'acide aminé pourraient avoir un impact (effet neutre ou délétère) sur la fonction biologique de la protéine VKORC1. L'analyse a concerné la totalité de la séquence protéique incluant les deux substitutions p.A34V et p.S57C. Les résultats obtenus (Figure 37) ont indiqué que la substitution p.A34V serait considérée comme neutre, alors que la seconde substitution p.S57C serait considérée comme délétère.



**Figure 37** : Prédiction à l'aide du logiciel PROVEAN de l'effet des variants protéiques de VKORC1 p.A34V et p.S57C identifiés chez les bovins de race corse et le taureau de race Limousine (Albistur A.)

**Légende** : Le score PROVEAN est significatif (mutant délétère) si sa valeur est supérieure à -2.5 (cutoff). En dessous de cette valeur, le variant est considéré comme neutre.

## Discussion

Ce travail expérimental avait pour objectif d'étudier si d'éventuelles variations de séquences et/ou mutations présentes au sein de la séquence codante du gène *VKORC1* pouvaient expliquer l'hyposensibilité au féruléol constatée chez les bovins de race Corse, par rapport aux autres races bovines. Pour cela, nous avons amplifié et séquencé les trois exons de la séquence codante du gène *VKORC1* à partir de 61 échantillons de sang issus de dix races de vaches différentes, dont six vaches de race Corse, puis les avons séquencés et comparés avec la séquence de référence *bovVKORC1* de *Bos taurus* (AC\_000182.1). Enfin nous avons soumis les séquences protéiques à une analyse informatique avec des logiciels disponibles en ligne afin de déterminer si les changements observés au sein de la séquence protéique pouvaient avoir un effet délétère, ou pas, sur la protéine VKORC1.

### **Au sujet du matériel**

Afin de répondre à notre question de recherche, nous devons disposer d'échantillons de bovins de races différentes, en complément des six échantillons de race Corse, objet de notre étude. Il était nécessaire d'évaluer le degré de conservation ou de polymorphisme de séquence du gène *VKORC1* chez les différentes races bovines. Ainsi pour chaque race de vache intégrée à l'étude, nous avons pu disposer d'au moins cinq échantillons, ils ont été récoltés au cours de plusieurs campagnes de prélèvements.

Les échantillons issus des six vaches de race corse ont été récoltés en 2019 auprès de vétérinaires exerçant en Corse. Le numéro national d'identification (ID National) de ces bovins n'a malheureusement pas été communiqué, rendant impossible l'accès aux données SIGAL et à la généalogie de ces individus. En revanche, ce numéro ID National est connu pour la majorité des bovins des autres races sauf pour 17 d'entre eux où seul le numéro abrégé de travail a été transmis.

### **Au sujet de la méthode**

Dans ce travail, toutes les étapes du protocole expérimental (extraction de l'ADN, amplification PCR et obtention de produits de qualité pour le séquençage nucléotidique) ont été menées sans problème particulier. En effet, les conditions de la PCR ont été correctement optimisées (non décrit dans ce travail) si bien que les migrations sur gel d'agarose n'ont révélé qu'une seule et unique bande d'amplification, comme théoriquement attendu. Les échantillons amplifiés ont été de qualité suffisante pour être envoyés pour séquençage à la société prestataire.

Pour cette étude, nous avons choisi de nous concentrer en priorité sur les trois exons de la séquence codant la protéine *VKORC1*, sans analyser les introns ni les portions non codantes du gène *VKORC1*. En effet, même si certaines études du polymorphisme du gène *VKORC1* chez l'Homme, chez le rat et chez la souris ont pu montrer l'existence de mutations, présentes au sein des introns ou de parties non codantes et associées à un phénotype de résistance ou d'hypersensibilité aux AVK (tableau 6 et tableau 7) (Greaves et Ayres, 1976 ; Buck and Smith, 2015 ; Li, 2006 ; Hodroge, 2011), il était important dans un premier temps de concentrer nos efforts sur la séquence codante du gène. Nous avons identifié trois variants SNP, dont deux non silencieux dans l'exon 1, ce qui a conforté l'intérêt de ce choix méthodologique.

De plus, le mode opératoire que nous avons adopté est relativement coûteux (prix de la prestation de séquençage notamment), et il ne peut pas être appliqué à une grande quantité d'échantillons. Ainsi, si nous souhaitions confirmer l'existence de ces variants chez les vaches de race Corse et explorer un plus grand nombre d'échantillons, toutes races bovines confondues, il conviendrait de réaliser un génotypage spécifique de la zone d'intérêt (c'est à dire de la portion de l'exon 1 siège des deux SNP c.101C>T et c.170C<G) en optimisant un génotypage par PCR en temps réel via l'utilisation de quatre sondes TaqMan.

Il serait également intéressant de compléter notre étude par un dosage du féruléol plasmatique sur les bovins prélevés. Ceci permettrait de récolter un plus grand nombre d'échantillons avec des profils différents : bovins Corses et bovins d'autres races, avec ou sans contact avec de la férule, sur le bassin méditerranéen.

Les analyses réalisées pour ce projet ont été conduites pendant l'année scolaire 2019/2020. Il s'agissait pour moi d'une année « allégée » en terme d'emploi du temps suite à mon redoublement et à l'anticipation de certaines matières de l'année scolaire n+1. Le temps dégagé devait me permettre de réaliser la totalité des manipulations et analyses dans le cadre de cette thèse d'exercice vétérinaire expérimentale. Malheureusement, la soudaineté de la pandémie de COVID-19 et les conséquences du premier confinement total ont fortement impacté notre capacité à approfondir ces analyses, et plus particulièrement à recruter davantage d'échantillons issus de vaches de race Corse.

## **Polymorphisme du gène *VKORC1***

Notre protocole expérimental avait pour but de répondre à une question principale : existe-il un polymorphisme génétique du gène *VKORC1* chez les bovins ? D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que oui ! Pour rappel, le gène *VKORC1* (environ 2,2kb) se compose de trois exons. Chez les 61 bovins intégrés dans l'étude, seulement sept d'entre eux ont présenté des variants SNP, dont deux se traduisaient par des mutations faux-sens :

- Deux bovins corses ont présenté une mutation hétérozygote sur l'exon 1 (c.170C>G), qui produit une mutation faux sens de la chaîne protéique (p.Ser57Cys)
- Les cinq autres individus mutés (quatre bovins de race Corse et un taureau de race Limousine) ont présenté deux mutations homozygotes sur l'exon 1 (c.101C>T et c.170C>G), entraînant également une modification de la chaîne protéique (p.Ala34Val et p.Ser57Cys).
- Une mutation muette était également présente sur l'exon 3 chez ces sept individus

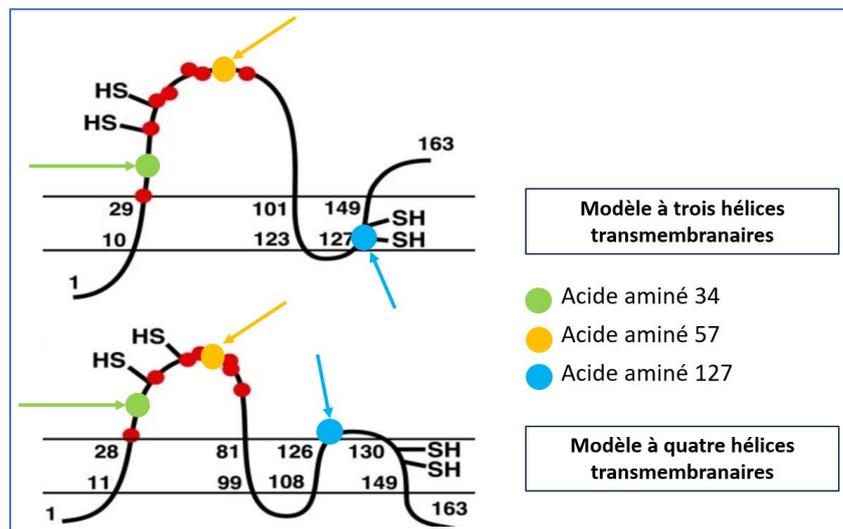
Il est étonnant qu'un seul individu issu d'une race continentale non Corse (bovin Vf14, mâle de race Limousine pure) présente exactement les deux mêmes mutations non silencieuses que les bovins de race Corse dans l'exon 1, et également le SNP silencieux de l'exon 3. Comme l'indique son numéro d'identification national (FR7122208829), cet animal est né dans le département de Saône et Loire, il appartenait à un élevage dans lequel nous avons effectué un autre prélèvement, une vache charolaise qui ne présentait pas de mutation. Nous avons alors contacté l'éleveur pour récolter des informations sur cet animal, notamment au sujet de sa provenance et sa généalogie. Il nous avait expliqué qu'il avait acheté ce jeune bovin chez un maquignon dans les semaines précédant le prélèvement, et qu'il ne savait rien de précis sur ses origines. De plus, étant trop jeune, ce jeune mâle ne faisait pas encore partie de la campagne de reproduction, donc nous n'avons pas pu récolter d'échantillon sur sa descendance. Nous avons ultérieurement pu consulter son dossier dans la base de données nationale SIGAL, : ses deux géniteurs étaient également des bovins de race pure Limousine. Le taureau Vf14 a finalement été abattu le 13/07/2021 pour la filière boucherie.

Nous ne pouvons écarter la possibilité que son résultat puisse soit être lié à une contamination par d'autres produits PCR de bovins corses, ou plus probablement à une erreur d'échantillonnage (au moment de la PCR ou lors du séquençage nucléotidique). Pour écarter cette éventualité, il aurait été nécessaire de recommencer l'amplification PCR de l'ADN du bovin Vf14 et de faire confirmer la séquence nucléotidique. Ceci n'ayant pas été réalisé, nous ne sommes pas en mesure d'aller plus loin dans la discussion concernant cet individu. Cependant, compte tenu de l'absence de lien généalogique avec les bovins de race Corse, c'est une hypothèse qui semble assez plausible. Aussi, nous ne discuterons pas davantage le cas de ce bovin de race Limousine (le seul individu de race continentale présentant les trois SNP de type « vache Corse ») et dont le résultat de séquençage n'a pu être confirmé.

Nous avons utilisé différents logiciels disponibles en ligne afin d'aligner les séquences protéiques (séquence sauvage de *Bos taurus* et séquence mutée de type vache Corse) et de prédire l'impact potentiel de ces mutations sur la protéine VKORC1. C'est en effet la première fois que le polymorphisme du gène VKORC1 est exploré chez les bovins, aucune mutation n'ayant été décrite à ce jour.

L'alignement nucléotidique a permis de repérer la localisation des deux SNP de l'exon 1 sur la séquence nucléotidique codante du gène *VKORC1*. Nous avons ensuite prédit la séquence protéique codée par ces variants et situé les substitutions protéiques par rapport aux deux modèles proposés pour représenter la structure de la protéine VKORC1 : modèles à deux et à trois hélices transmembranaires (figure 37) ((Hammed, 2014).

Que ce soit avec le modèle à trois ou à quatre hélices transmembranaires, les deux mutations p.Ala34Val et p.Ser57Cys sont situées dans la boucle extracellulaire.



**Figure 38** : Localisation des acides aminés substitués sur la protéine VKORC1 d'après les modèles à deux ou trois hélices transmembranaires (Albistur A.,2022)

Quel que soit le modèle (trois ou quatre hélices transmembranaires (Hammed, 2014)), les mutations p.Ala34Val et p.Ser57Cys sont situées dans la boucle extracellulaire. A titre de comparaison, la mutation silencieuse p.L127 de l'exon 3 a également été représentée

Chez quatre des six bovins de race Corse, l'alanine en position 34 est remplacée par une valine : ces deux acides aminés font partie de la même famille (aliphatique avec une chaîne hydrophobe), et possèdent globalement les mêmes propriétés. Ceci est confirmé par les prédictions fournies par le logiciel MutPred (score MutPred2 non significatif) et PROVEAN (variant neutre). Ainsi, il semble peu probable que la substitution p.Ala34Val soit impliquée dans le phénomène de résistance des bovins au féruléol. Rappelons que cette mutation n'était présente que chez quatre des six vaches de race corse.

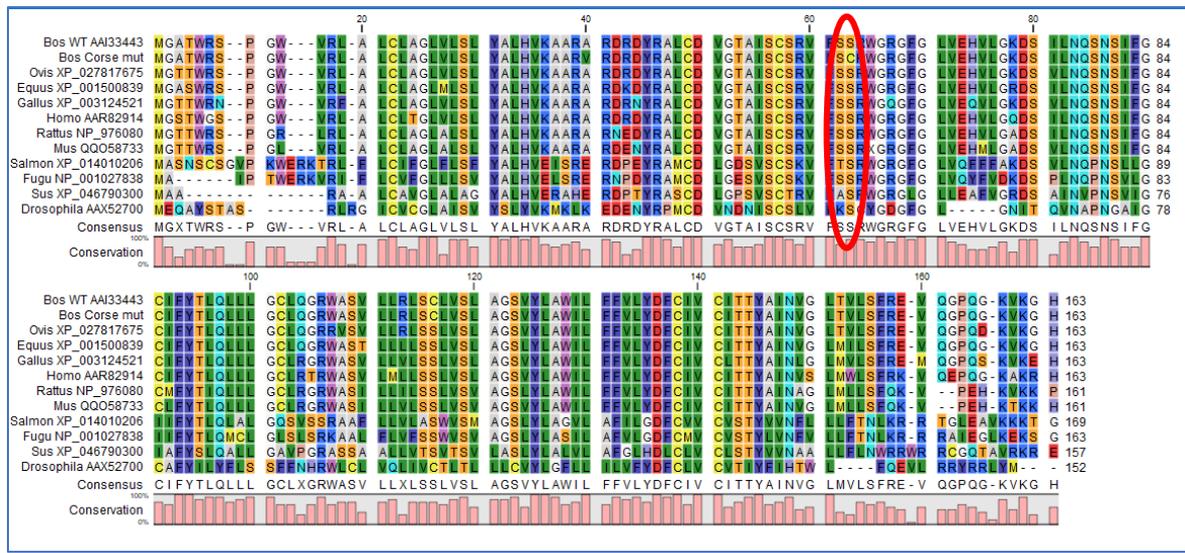
En revanche, la seconde mutation P.Ser57Cys (sérine en position 57 remplacée par une cystéine) semble davantage significative. En effet, elle est non seulement retrouvée chez la totalité des six bovins de race corse analysés (SNP à l'état homozygote chez quatre bovins sur six et à l'état hétérozygote chez les deux autres). De surcroit, la prédiction de résultat cohérent obtenu avec les deux logiciels de modélisation indique une modification non neutre de la protéine, PROVEAN prédisant même un mutant délétère. La sérine et la cystéine possèdent des propriétés différentes puisque la sérine est un composé hydroxylé avec une chaîne polaire, alors que la cystéine est un acide aminé spécial, soufré, capable de former un pont disulfure avec une autre cystéine. Rappelons toutefois que le site catalytique de la protéine VKORC1 correspond à un modèle de type « Cys-X-X-Cys » (Garcia et Reistma, 2008), ce dernier est situé au niveau des résidus C132 et C135 chez le bovin, zone correspondant au segment transmembranaire terminal de la protéine VKORC1 (figure 37).

De plus, il semble concevable que la présence de cette cystéine additionnelle puisse conduire à la formation d'un nouveau pont disulfure avec une des cystéines de la portion amino-terminale de la protéine (C51, C43 ou C16, toutes universellement conservées inter-espèces). Ceci aurait des répercussions sur le repliement de la protéine, et par conséquent sur son activité biologique, comme ceci a déjà été documenté chez l'Homme (p.Trp59Cys – résistance au phenprocoumone, Watzla et al., 2011).

Nous avons également examiné les mutations déjà répertoriées chez l'Homme et le rat autour du résidu en position 57, ainsi que les conséquences de ces mutations et les avons comparées avec celle trouvée chez les bovins corses. Comme l'indiquent le tableau 14 et l'alignement des différentes séquences de VKORC1 multi-espèces (figures 34, 38 et 39), la sérine 57 est universellement conservée chez les mammifères (Homme, bovin, cheval, ovin, porc, rat et souris) les oiseaux (poule), poissons (saumon et takifugu), et même chez la drosophile. Cette sérine 57 fait probablement partie des acides aminés exerçant un rôle capital vis-à-vis de l'activité de la protéine VKORC1.

**Tableau 14** : Exemple de substitutions protéiques autour de l'acide aminé 57 de la protéine VKORC1 chez l'Homme, le rat et les bovins (Greaves et Ayres, 1976 ; Watzka et al., 2011 ; Albistur A.)

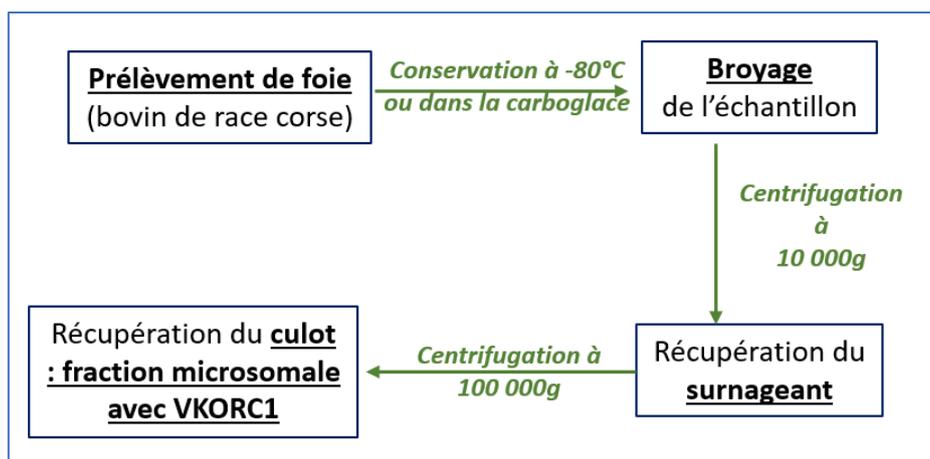
Espèces	Mutation protéique	Conséquence
<b>Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)</b>	p.Ser56Pro	Pas de résistance connue aux AVK
<b>Homme (<i>Homo sapiens</i>)</b>	p.Ser52Leu	Résistance au Phenprocoumone (AVK oral)
	p.Ser52Trp	
	p.Ser56Phe	
<b>Bovin (<i>Bos taurus</i>)</b>	p.Ser57Cys	Résistance au féculénol ?



**Figure 39 :** Alignement des séquences protéiques de VKORC1 de plusieurs espèces, issu du logiciel CLC sequence Viewer (Albistur A.). La sérine en position 57 (mutant p.S57C) est universellement conservée chez toutes les espèces.

Légende : Bos\_T\_HT = Bos taurus, séquence bovine sauvage sauvage ; Bos\_T\_Corsica = Bovin corse ; Ovis\_A = ovin ; Equus\_C = cheval ; Gallus\_G = poule ; Homo\_S = Homme ; Rattus\_M = Rat ; Mus\_M = Souris ; Salmon\_S = Saumon ; Takifugu\_R = Fugu ; Sus\_S = Porc ; Drosophila\_M = Drosophile. Toutes les séquences protéiques ont été extraites du site NCBI GeneBank

Afin de confirmer l'hypothèse du rôle fonctionnel de la Sérine en position 57, il serait intéressant de comparer l'activité enzymatique de la protéine VKORC1 des bovins mutés et non mutés. Plusieurs techniques existent pour mesurer l'activité enzymatique de VKORC1, que ce soit à partir de microsomes hépatiques (Hodroge, 2011), grâce à des levures recombinantes (Hodroge, 2011) ou suite à la transfection de cellules eucaryotes en culture (Pelz et al., 2005 ; Rost et al., 2009). Dans cette étude, nous avons envisagé d'étudier l'activité enzymatique de VKORC1 grâce à des microsomes hépatiques extraits d'échantillons de foie prélevés sur des bovins corses (les deux autres techniques étant plus lourdes et complexes à mettre en œuvre dans le temps qui nous était imparti pour cette étude). Mais cette fois encore, la pandémie et l'impossibilité d'avoir recours à des prélèvements de foie provenant de l'un des six bovins de race corse génotypés, ne nous ont pas permis de poursuivre dans cette direction. Le protocole qui aurait été utilisé pour étudier l'activité protéique de VKORC1 est présenté ci-après.



**Figure 40** : Méthode expérimentale de l'expression de l'activité protéique à partir de microsomes hépatiques

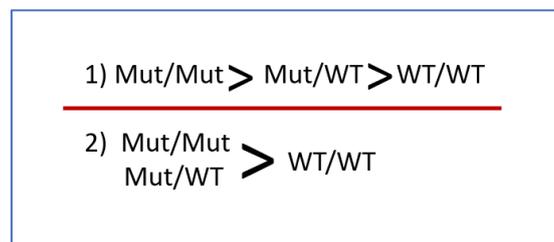
La fraction microsomale extraite contient l'enzyme VKORC1. Ainsi, pour mesurer l'activité de VKORC1, la protéine est mise en présence d'un réducteur (DTT = dithiothréitol), et un dosage de la vitamine K réduite est réalisé par spectrométrie de masse. De ce fait, l'activité basale de l'enzyme est mesurée. Puis, un inhibiteur de l'activité VKOR (gamme de concentration d'une molécule antivitamin K) est ajouté à la préparation, le but étant de déterminer si l'activité de l'enzyme diminue. Dans le cas des bovins mutés de race corse, notre hypothèse serait en faveur d'une inhibition moindre ou nulle de l'activité enzymatique de VKORC1, malgré l'adjonction d'anticoagulant, hypothèse que nous n'avons malheureusement pas pu confirmer.

En supposant que les deux variants SNP présents dans l'exon 1 du gène VKORC1 que nous avons identifiés chez les vaches corses soient les seuls responsables de la résistance des bovins corses au féculéol, nous nous sommes demandés pourquoi ces mutations sont apparues. La première des hypothèses serait que l'exposition quotidienne des animaux au féculéol aurait pu agir comme une pression de sélection environnementale, elle aurait contraint la race à s'adapter (rappelons que la physiologie digestive des ruminants fait que leur exposition au féculéol est continue en cas de consommation de férule [Louvet et *al.*, 2015]). En effet, les individus d'une même espèce vivant dans des conditions environnementales différentes (contraintes dites « abiotiques ») peuvent être sélectionnés localement pour développer un trait physiologique adaptatif, ici la contrainte étant une alimentation très riche en anticoagulant. Cette capacité des organismes à ajuster leurs traits aux ressources disponibles dans l'environnement est nommée « plasticité phénotypique ». Un exemple représentatif de cette plasticité est l'adaptation des rats suite à l'apparition et à l'utilisation massive des rodenticides : plusieurs foyers de résistance sont apparus avec l'utilisation des molécules anticoagulantes, les individus présentant une meilleure adaptation à ces conditions ont naturellement été sélectionnés et ce sont essentiellement les rats résistants qui ont pu survivre et transmettre « le trait de résistance » aux AVK (Greaves et Ayres, 1976 ; Buck and Smith, 2015).

Dans notre étude, les campagnes de prélèvements ont permis d'obtenir des échantillons sanguins de bovins provenant de différentes zones géographiques, zones avec ou sans férule (la férule se développe en Corse et sur le pourtour méditerranéen). L'exposition des animaux au féruléol est différente, puisque seuls les bovins corses y sont exposés de manière continue, et seuls les bovins de race Corse présentent une séquence de *VKORC1* différente de celle de *bovVKORC1* de *Bos taurus*.

Enfin, dans l'hypothèse d'une relation causale entre la mutation p.S57C et la résistance au féruléol, nous nous sommes interrogés sur le mode d'expression de l'allèle muté et sur le phénotype de résistance des animaux mutés. En effet, le tableau 14 montre que la mutation chez le rat n'entraîne aucune résistance aux AVK, alors que celles recensées chez l'Homme provoquent une résistance à certaines molécules anticoagulantes. De plus, parmi les bovins mutés, deux des bovins corses présentent la mutation à l'état hétérozygote. On peut donc se demander si l'allèle de résistance est dominant ou récessif ?

- Dans le cas où l'allèle serait récessif (figure 41, 1)) : les individus homozygotes mutés (Mut/Mut) seraient plus résistants au féruléol que les individus hétérozygotes (WT/Mut).
- Si l'allèle muté montre un caractère dominant par rapport à l'allèle sauvage (figure 41, 2)) : les individus homozygotes mutés (Mut/Mut) seraient tout aussi résistants que les individus hétérozygotes (WT/Mut).



**Figure 41** : Classement des phénotypes de résistance supposés des animaux en fonction de leur génotype et du caractère récessif ou dominant de l'allèle muté (Albistur A)

*Légende* : Mut = allèle muté ; WT = « wilde type » = allèle non muté de type sauvage

Finalement, si une relation de causalité était démontrée entre le SNP c.170C>G de *VKORC1* (mutation p.S57C) et le phénotype d'hyposensibilité au féruléol chez les bovins mutés, les éleveurs dont les exploitations sont situées en Corse et sur le pourtour méditerranéen auraient tout intérêt à réaliser des croisements avec des bovins corses pour introduire l'allèle muté dans leurs élevages. Ceci permettrait aux éleveurs présents dans ces zones à risques de limiter les pertes économiques engendrées par les cas d'intoxications des animaux au féruléol.

## Conclusion

La vitamine K fait partie de la famille des vitamines lipophiles. Même si ses fonctions sont moins connues que celles des autres vitamines, son rôle dans l'organisme reste primordial et essentiel, puisqu'elle permet l'activation de facteurs de coagulation vitamine-K dépendants. Ces derniers sont directement responsables de l'équilibre du phénomène de coagulation sanguine décrit chez les animaux. La vitamine K est présente dans l'alimentation (notamment dans les légumes verts), mais les réserves de l'organisme sont assez faibles. Ainsi, le métabolisme de cette molécule se découpe en trois phases qui assurent son renouvellement et sa réutilisation constants dans l'organisme. Parmi toutes les protéines intervenant dans ce cycle, la Vitamine K époxyde réductase sous-unité 1 (*VKORC1*) est l'enzyme qui assure la réduction de la vitamine K 2,3-époxyde réductase en vitamine K quinone. C'est donc une enzyme qui joue un rôle clé dans la coagulation sanguine, mais qui est certainement impliquée dans d'autres phénomènes biologiques non explorés à ce jour. Cependant, des études montrent que ses actions peuvent être inhibées par d'autres types de molécule, notamment pas les anticoagulants anti-vitamine K. Les mécanismes impliqués dans cette inhibition restent toutefois à préciser.

Bien que différents types d'anticoagulants soient utilisés en médecine humaine pour la prévention ou le traitement de pathologies sanguines, leur utilisation en médecine vétérinaire est principalement destinée à la lutte contre les rongeurs nuisibles. Ainsi, le marché international des rodenticides est en pleine évolution depuis les années 1950. Les anticoagulants rodenticides sont fréquemment impliqués dans les intoxications des carnivores domestiques aux anticoagulants. Les cas recensés ont permis de constater une variation de réponse des organismes à ces molécules anticoagulantes, tant en médecine humaine que dans le domaine vétérinaire. De plus, les études menées sur la protéine et le gène *VKORC1* ont montré que certaines des variations de réponses sont dues au polymorphisme du gène dans près de 50% des cas, alors que d'autres éléments comme les interactions médicamenteuses ou des différences inter et intra-individuelles seraient également impliquées dans cette variation de réponse.

A ce jour, le polymorphisme du gène *VKORC1* a essentiellement été étudié que chez l'Homme et les rongeurs, et les données concernant les autres espèces sont rares. Ainsi, c'est parce que le nombre de cas d'intoxication à la férule ne cesse d'augmenter chez de nombreuses races bovines que nous avons décidé d'étudier le polymorphisme de ce gène chez les bovins. En effet, la férule est une plante présente sur tout le pourtour méditerranéen, elle est très riche en anticoagulant, notamment en féruléol, et sa consommation entraîne l'apparition d'un syndrome hémorragique appelé « férulose ». Dans le travail expérimental de cette thèse, après avoir extrait et séquencé la séquence codante du gène *VKORC1* de 61 bovins appartenant à dix races différentes.

Nous avons identifié trois variants SNP chez les bovins de race Corse, l'un d'entre eux étant silencieux. Les deux autres variants situés dans l'exon 1 entraînent des modifications au niveau de la chaîne protéique chez les bovins de race corse analysés p.Ala34Val et p.Ser57Cys. Le

variant p.Ala34Val a été identifié à l'état homozygote chez seulement quatre des six bovins corses, alors que le variant p.Ser57Cys est présent à l'état homozygote ou hétérozygote chez les six bovins de race Corse. Seul le variant p.Ser57Cys est prédit comme délétère pour l'activité de la protéine VKORC1. De plus, la sérine 57 est uniformément conservée chez toutes les espèces (mammifères, oiseaux, poissons et même la drosophile), elle fait probablement partie des acides aminés exerçant un rôle capital vis-à-vis de l'activité de la protéine VKORC1. Dans la mesure où la consommation de fêrulle par les bovins corses a été prouvée et que l'absence de syndrome de fêrulose chez ces animaux est constatée, cette relation de causalité entre l'implication de cette mutation génétique dans la résistance de ces animaux aux anticoagulants est fortement suspectée. D'autres expériences seraient nécessaires pour confirmer la relation de causalité entre la mutation p.Ser57Cys.

Finalement, si la relation de causalité entre la mutation p.S57C et le phénotype d'hyposensibilité au fêrulénol chez les bovins mutés est démontrée, les éleveurs des zones à risque (présence de fêrulle dans les pâtures) auraient intérêt à introduire l'allèle muté dans leurs élevages. Ceci permettrait de limiter les pertes économiques engendrées par les cas de « fêrulose ».

## Bibliographie

AGENCE NATIONALE DE LA SECURITE DU MEDICAMENT ET DES PRODUITS DE LA SANTE, 2014. *Les anticoagulants en France en 2014 : état des lieux , synthèse et surveillance*. Rapport de l'ASNM. 78p.

ARAGNO M., TAGLIAPIETRA S., NANO GM., UGAZIO G., 1988. Experimental studies on the toxicity of *Ferula communis* in the rat. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, Vol. 59, n°3, p399–402.

ARMENGAUD D. 1988. Actualité de la vitamine K. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*. Vol.1, n°5, p282–286. DOI:10.1016/S0987-7983(88)80137-3.

BAKEER M., 2016. Coagulation System: New Concepts for Novel Therapeutics. *Journal of Clinical & Experimental Cardiology*. Vol.7, n°10. p1-3. DOI:10.4172/2155-9880.1000471.

BAL dit SOLLIER C., DROUET L., 2009. Vitamine K, antivitamine K et alimentation. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. Vol.44, n°6. p273–277. DOI:10.1016/j.cnd.2009.11.003.

BARKHAN P., SHEARER MJ., 1977. Metabolism of vitamin K1 (phylloquinone) in man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. Vol.70, n°2. p93–96.

BEZEAUD A., GUILLIN MC., 2010. *Physiologie de l'hémostase, MHEMO*. URL : <https://mhemmo.fr/les-pathologies/physiologie-de-lhemostase/> [consulté le 3 mars 2022].

BODIN L., HORELLOU MH., FLAUJAC C., LORIOT MA., SAMAMA MM., 2005. A vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with vitamin K antagonist resistance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Vol.3, n°7. p1533–1535. DOI:10.1111/j.1538-7836.2005.01449.x.

BODIN L., PERDU J., DIRY M., HORELLOU MH., LORIOT MA., 2008. Multiple genetic alterations in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene (VKORC1) can explain the high dose requirement during oral anticoagulation in humans. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. Vol.6, n°8. p1436–1439. DOI:10.1111/j.1538-7836.2008.03049.x.

BONNIER G., DOUIN R., 1990. *La grande flore en couleur, volume 2 (planches)*. Belin. Paris. 355p.

BONNIER G., DOUIN R., 1998. *La grande flore en couleur, volume 1*. Belin. Paris. 373p.

BORGEAT K., WRIGHT J., GARROD O., PAYNE JR., FUENTES VL., 2014. Arterial thromboembolism in 250 cats in general practice: 2004-2012. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol.28, n°1. p102–108. DOI:10.1111/jvim.12249.

BOYLE CM., 1960. Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons. *Nature*. Vol.188, n°4749. p517. DOI:10.1038/188517a0.

BROWN A., WADDEL L., 2015. Rodenticides. *Small animal Critical Care Medecine*. Elsevier. Oxford. p591–596.

BUCKLE A., SMITH R., 2015. *Rodents pests and their control (2nd edition)*. Wallingford, Oxfordshire, Boston, MA. CAB. Boston. 422p.

CAEN J., JOSSO F., SULTAN Y., ALLAIN JP., 1970. *L'hémostase : physiologie, exploration fonctionnelle*. Vol.1. l'Expansion scientifique française. Paris. 147p

CAO Z., VAN LITH M., MITCHELL L., PRINGLE MA., INABA K, BULLEID NJ., 2016. The membrane topology of vitamin K epoxide reductase is conserved between human isoforms and the bacterial enzyme. *The Biochemical Journal*. Vol.473, n°7. p851–858. DOI:10.1042/BJ20151223.

CHADHA DS., BHARADWAJ P., 2017. Direct acting oral anticoagulant: Bench to bedside. *Medical Journal, Armed Forces India*. Vol.73, n°3. p274–281. DOI:10.1016/j.mjafi.2016.11.013.

CHAPIN JC., HAJJAR KA., 2015. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. Vol.29, n°1. p17–24. DOI:10.1016/j.blre.2014.09.003.

COMBS G., MCCLUNG J., 2017. *The vitamins : fundamental aspects in nutrition and health (5th edition)*. Elsevier, Academic Press. London, San Diego, Cambridge, Kidlington. 612p.

CONSTABLE PD., HINCHCLIFF KW., DONE SH., GRÜNBERG W., 2017. Chapitre 10 - Diseases of the Cardiovascular System. *Veterinary Medicine (Eleventh Edition)*. W.B. Saunders. p657–715. DOI:10.1016/B978-0-7020-5246-0.00010-3.

CONSTABLE PD., HINCHCLIFF KW., DONE SH., GRÜNBERG W., 2017. Chapitre 12 - Diseases of the Respiratory System. *Veterinary Medicine (Eleventh Edition)*. W.B. Saunders. p845–1090. DOI:10.1016/B978-0-7020-5246-0.00012-7.

CUNNINGHAM S., RODERICK K., 2016. Overview of Thrombosis, Embolism, and Aneurysm in Animals - Circulatory System - Veterinary manual. MSD manual. 7p. DOI: 10.1016/B978-0-7020-5246-0.00010-3

DAM H., 1935. The antihæmorrhagic vitamin of the chick. *The Biochemical Journal*. Vol.29, n°6. p1273–1285. DOI:10.1042/bj0291273.

D'ANDREA G., D'AMBROSIO RL., DI PERNA P., CHETTA M., SANTACROCE R., 2005. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. Vol.105, n°2. p645–649. DOI:10.1182/blood-2004-06-2111.

DAVIDSON CJ., TUDDENHAM EG., MCVEY JH., 2003. 450 million years of hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, Vol.1, n°7. p1487–1494. DOI:10.1046/j.1538-7836.2003.00334.x.

DERIN H., YILDIRIM G., ÇAKSEN H., 2013. Intoxication from *Ferula sumbul* leaves in a mother and her infant. *Journal of Pediatric Intensive Care*. Vol.2, n°4. p193–194. DOI:10.3233/PIC-13066.

DESMARD M., HELLMANN R., PLANTEFEVE G., MENTEC H., 2009. Severe overdose in vitamin K antagonist secondary to grapefruit juice absorption. *Annales Francaises D'anesthesie Et De Reanimation*. Vol.28, n°10. p897–899. DOI:10.1016/j.annfar.2009.07.086.

EDWARDS DF., RUSSELL RG., 1987. Probable vitamin K--deficient bleeding in two cats with malabsorption syndrome secondary to lymphocytic-plasmacytic enteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol.1, n°3. p97–101. DOI:10.1111/j.1939-1676.1987.tb01995.x.

ENGELKING LR., 2015. Vitamin K. *Textbook of veterinary physiological chemistry*. Elsevier. London, San Diego, Waltham. p299–303.

FAURE S., 2013. Antivitamines K. *Actualités pharmaceutiques*. Vol.52, n°523. DOI:10.1016/j.actpha.2012.12.002.

FRAIGUI O., LAMNAOUER D., FAOUZI MY., 2002. Acute toxicity of ferulenol, a 4-hydroxycoumarin isolated from *Ferula communis* L. *Veterinary and human toxicology*. Vol.44, n°1. p5–7.

FREGIN A., ROST S., WOLZ W., KREBSOVA A., MULLER CR., OLDENBURG J., 2002. Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood*. Vol.100, n°9. p3229–3232. DOI:10.1182/blood-2002-03-0698.

GAIKWAD T., GHOSH K., SHETTY S., 2014. VKORC1 and CYP2C9 genotype distribution in Asian countries. *Thrombosis Research*. Vol.134, n°3. p537–544. DOI:10.1016/j.thromres.2014.05.028.

GAMELIN L., HARRY P., 2005. Rodenticides. *EMC - Toxicology-Pathologie*. Vol.2, n°3. p89–97. DOI:10.1016/j.emctp.2005.05.001.

GARCIA AA., REITSMA PH., 2008. VKORC1 and the vitamin K cycle. *Vitamins and Hormones*. Vol.78. p23–33. DOI:10.1016/S0083-6729(07)00002-7.

GAULT G., RIERA M., BERNY P., BENOIT E., GRANCHER D., 2013. Giant Fennel (*Ferula communis* L.) Intoxications in Livestock in France. 5p.

GAULT G., FOUREL I., LEFEBVRE S., LATTARD V., GRANCHER D., 2017. Exposure of unweaned calves to the toxic compound of giant fennel'. *Congress of the Society of Veterinary and Comparative Nutrition (ESVCN)*. [URL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01590514>]

GAULT G., LEFEBVRE S., BENOIT E., LATTARD V., GRANCHER D., 2019. Variability of ferulenol and ferprenin concentration in French giant fennel (*Ferula* sp.) leaves. *Toxicon*. Vol.165, p47–55. DOI:10.1016/j.toxicon.2019.04.010.

GEDDINGS JE., MACKMAN N., 2014. New players in haemostasis and thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. Vol.111, n°4. p570–574. DOI:10.1160/TH13-10-0812.

GEISEN C., MATZKA M., SITTINGER K., STEFFENS M., DAUGELA L., SEIFRIED E., *et al.*, 2005. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thrombosis and Haemostasis*. Vol.94, n°4. p773–779. DOI:10.1160/TH05-04-0290.

GERSPACH C., WIRZ M., BRAUN U., 2011. Thrombosis of the cranial vena cava in a cow with bronchopneumonia and traumatic reticuloperitonitis. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*. Vol.52, n°11. p1228–1231.

GILL J., KERINS GM., LANGTON SD., MACNICOLL AD., 1993. The development of a blood clotting response test for discriminating between difenacoum-resistant and susceptible Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Comparative biochemistry and physiology Part C: comparative pharmacology*. Vol.104, n°1. p29–36. DOI:10.1016/0742-8413(93)90106-U.

GILL J., KERINS GM., LANGTON SD., MACNICOLL AD., 1994. Blood-clotting response test for bromadiolone resistance in norway rats. *The journal of Wildlife management*. Vol.58, n°3. p454–461. DOI:10.2307/3809316.

GREAVES JH., AYRES PB., 1976. Inheritance of Scottish-type resistance to warfarin in the Norway rat. *Genetical Research*. Vol.28, n°3. p231–239. DOI:10.1017/s001667230001692x.

GREAVES JH., AYRES PB., 1967. Heritable resistance to warfarin in rats. *Nature*. Vol.215, n°5103. p877–878. DOI:10.1038/215877a0.

GULATI S., GULATI A., 2018. Anticoagulant rodenticide poisoning. *Indian Journal of Medical Specialities*. Vol.9, n°3. p150–153. DOI:10.1016/j.injms.2018.04.010.

HAMMED A., 2014. Résistance de cible aux antivitamines K : Analyses des conséquences catalytiques de différentes mutations de VKORC1 et étude du rôle d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1. Thèse de doctorat universitaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Université Claude Bernard Lyon 1. 109p

HAMY T., 2006. Les médicaments inhibant les hémostases primaire et secondaire : pharmacologie, toxicologie et application thérapeutiques chez les carnivores domestiques. Thèse d'exercice vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Faculté de médecine de Créteil. 79p.

HILL TR., MORRISSEY P., 2011. Vitamins - Vitamin K. p661–666. DOI:10.1016/B978-0-08-100596-5.01080-5.

HODROGE A., 2011. *Les mutations spontanées du gène Vkorc1 chez l'homme et le rat : réalité de la résistance*. Université Claude Bernard. Lyon 1. 195p.

JANDREY K., 2012. Thromboembolie chez le chat : traitement actuel et perspectives d'avenir. *International Veterinary Information Service*. Vol.22, n°1.

JIN NZ., GOPINATH SCB., 2016. Potential blood clotting factors and anticoagulants. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. Vol.84. p356–365. DOI:10.1016/j.biopha.2016.09.057.

JOBIN F., 1995. *L'hémostase*. Presses Université Laval. Quebec. 516p.

KOHN MH., PEL HJ., 1999. Genomic assignment of the warfarin resistance locus, *Rw*, in the rat. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*. Vol.10, n°7. p696–698. DOI:10.1007/s003359901073.

KOHN MH., PELZ HJ., 2000. A gene-anchored map position of the rat warfarin-resistance locus, *Rw*, and its orthologs in mice and humans. *Blood*, Vol.96, n°5. p1996–1998.

LAHMAR R., MAHJOUB T., FOUREL I., GAULT G., GRANCHER D., 2018. Giant fennel (*Ferula communis* L) intoxication in goats in Tunisia. *Veterinary Record Case Reports* . Vol.6. 738p. DOI:10.1136/vetreccr-2018-000738.

LAMNAOUER D., 1999. Anticoagulant activity of coumarins from *Ferula communis* L. *Thérapie*. Vol.54, n°6. p747–751.

LAROCHE JP., BECKER F., SCHVED JF., 2018. Anticoagulants oraux directs (AOD) : une mise au point nécessaire. *Journal De Médecine Vasculaires*. Vol.43, n°3. p198–205. DOI:10.1016/j.jdmv.2018.02.005.

LAROCHE JP., SCHVED JF., 2016. Antivitaminiques K, anticoagulants oraux directs : où est la vérité ?. *Journal Des Maladies Vasculaires*. Vol.41, n°6. p383–388. DOI:10.1016/j.jmv.2016.10.002.

LENNARZ W., BAUMEISTER W., LANE M., 2013. *Encyclopedia of biological chemistry (2nd edition)*. Academic Press. 3232p.

LI T., LANGE LA., LI X., SUSSWEIN L., BRYANT B., MALONE R., *et al.*, 2006. Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation. *Journal of Medical Genetics*. Vol.43, n°9. p740–744. DOI:10.1136/jmg.2005.040410.

LORIOT MA., BEAUNE P., 2006. Vitamin K epoxide reductase: Fresh blood for oral anticoagulant therapies. *La Revue De Medecine Interne*. Vol.27, n°12. p979–982. DOI:10.1016/j.revmed.2006.09.004.

LOUVET MS., GAULT G., LEFEBVRE S., POPOWYCZ F., BOULVEN M., BESSE S., *et al.*, 2015. Comparative inhibitory effect of prenylated coumarins, ferulenol and ferprenin, contained in the “poisonous chemotype” of *Ferula communis* on mammal liver microsomal VKORC1 activity. *Phytochemistry*. Vol.118, p.124–130. DOI:10.1016/j.phytochem.2015.08.012.

MACFARLANE RG., 1964. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. Vol.202, n°4931. p498–499. DOI:10.1038/202498a0.

MONTASTRUC J., BAGHERI H., MONTASTRUC F., 2015. Antivitamines K. *La maladie thrombo-embolique veineuse*. Elsevier Masson, p. 328.

MONTI M., PINOTTI M., APPENDINO G., DALLOCCHIO F., ANTOGNONI F., POLI F., BERNARDI F., 2007. Characterization of anti-coagulant properties of prenylated coumarin ferulenol', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Vol.1770, n°10. p1437–1440. DOI:10.1016/j.bbagen.2007.06.013.

MÜLLER E., KELLER A., FREGIN ., MÜLLER CR., ROST S., 2014. Confirmation of warfarin resistance of naturally occurring VKORC1 variants by coexpression with coagulation factor IX and in silico protein modelling. *BMC genetics*. Vol.15, n°1. 7p. DOI:10.1186/1471-2156-15-17.

MURPHY M., 2018. Anticoagulant rodenticides. *Veterinary Toxicology*. Elsevier, p583–612.

OLDENBURG J., WATZKA M., ROST S., MÜLLER CR., 2007. VKORC1: molecular target of coumarins. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. Vol.5, supplément 1. p1–6. DOI:10.1111/j.1538-7836.2007.02549.x.

OLDENBURG J., MARINOVA M., MÜLLER-REIBLE C., WATZKA M., 2008. The vitamin K cycle. *Vitamins and Hormones*. Vol.78. p35–62.

OLDENBURG J., WATZKA M., BEVANS CG., 2015. VKORC1 and VKORC1L1: Why do Vertebrates Have Two Vitamin K 2,3-Epoxy Reductases ?. *Nutrients*. Vol.7, n°8. p6250–6280. DOI:10.3390/nu7085280.

OSMAN A., ENSTRÖM C., ARBRING K., SÖDERKVIST P., LINDAHL TL., 2006. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. Vol.4, n°8. p1723–1729. DOI:10.1111/j.1538-7836.2006.02039.x.

PALTA S., SAROA R., PALTA A., 2014. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*. Vol.58, n°5. p515–523. DOI:10.4103/0019-5049.144643.

PELZ HJ., ROST S., HÜNERBERG M., FREGIN A., HEIBERG AC., BAERT K., *et al.* 2005. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*. Vol.170, n°4. p1839–1847. DOI:10.1534/genetics.104.040360.

PERRIOT E., 2017. *Thrombose de la veine cave chez 14 vaches présentées à l'ENVA entre 2010 et 2017*. Thèse d'exercice vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Faculté de médecine de Créteil. 124p.

PINEDE L., NINET J., 1997. Current data on the treatment of venous thromboembolic disease. *La Revue De Medecine Interne*. Vol.18. p636–645. DOI:10.1016/s0248-8663(97)80710-2.

PRUVOT M., 2009. *Diagnostic de trypanosoma evansi : mise en place, standardisation et évaluation d'outils de PCR et d'Ac-ELISA : application à une étude préliminaire chez le bovin laitier en Thaïlande*. Thèse d'exercice vétérinaire. Toulouse. Université Paul-Sabatier. 106p.

RIEDER MJ., REINER AP., GAGE BF., NICKERSON DA., EBY CS., *et al.* 2005. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *The New England Journal of Medicine*. Vol.352, n°22. p2285–2293. DOI:10.1056/NEJMoa044503.

ROST S., FREGIN A., IVASKEVICIUS V., CONZELMANN E., HÖRTNAGEL K., *et al.* 2004. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. Vol.427, n°6974. p537–541. DOI:10.1038/nature02214.

ROST S., PELZ HJ., MENZEL S., MACNICOLL AD., 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 genetics*. Vol.10. p4. DOI:10.1186/1471-2156-10-4.

SAID HM., 2018. Intestinal Absorption of Vitamin K: Cellular and Molecular Mechanism. *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*. Academic Press, p1197–1199. DOI:10.1016/B978-0-12-809954-4.00053-0.

SAMAMA MM., 2009. *Hémorragies et thromboses - Du diagnostic aux traitements (2ème édition)*. Masson. 504p.

SHEARER MJ., FU X., BOOTH SL., 2012. Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*. Vol.3, n°2. p182–195. DOI:10.3945/an.111.001800.

SHEARER MJ., NEWMAN P., 2008. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thrombosis and Haemostasis*. Vol.100, n°10. p530–547. DOI:10.1160/TH08-03-0147.

SHLOSBERG A., EGYED MN., 1985. Experimental *Ferula communis* (giant fennel) toxicosis in sheep. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe A*. Vol.32, n°10. p778–784. DOI:10.1111/j.1439-0442.1985.tb02000.x.

SHORE R., 2018. Rodenticides : the good, the bad and the ugly. *Encyclopedia of the Anthropocene*. Elsevier, p155–160. ISBN : 978-0-12-813576-1

SIGRIST I., FRANCOZ D., LECLERE M., BUCZINSKI S., 2008. Antemortem diagnosis of caudal vena cava thrombosis in two cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol.22. p684–686.

SIGRIST I., FRANCOZ D., BUCZINSKI S., 2008. Dix cas de thrombose de la veine cave caudale. *Point vétérinaire*. Vol.284, p69–73.

SIGURET V., 2007. Antivitamines K et pharmacogénétique : vers une meilleure compréhension de la variabilité individuelle de l'effet dose-réponse. *Pathologie, biologie*. Vol.55, n°6. p295–298. DOI:10.1016/j.patbio.2007.04.001.

SIMPSON KM., STREETER RN., CRAMER S., LAMM CG., LOVE BC., 2012. Caudal vena caval thrombosis following treatment of deep digital sepsis. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*. Vol.53, n°2. p182–186.

STRIEKER MJ., MORRIS JG., FELDMAN BF., ROGERS QR., 1996. Vitamin K deficiency in cats fed commercial fish-based diets. *The Journal of Small Animal Practice*. Vol.37, n°7. p322–326. DOI:10.1111/j.1748-5827.1996.tb02400.x.

TIE JK., STAFFORD DW., 2017. Functional Study of the Vitamin K Cycle Enzymes in Live Cells. *Methods in Enzymology*. Vol.584 Elsevier, p349–394. ISBN : 978-0-12-812213-6

TLIGUI N., RUTH GR., 1994. *Ferula communis* variety *brevifolia* intoxication of sheep. *American Journal of Veterinary Research*. Vol.55, n°11. p1558–1563.

TLIGUI N., RUTH GR., FELICE LJ., 1994. Plasma ferulenol concentration and activity of clotting factors in sheep with *Ferula communis* variety *brevifolia* intoxication. *American Journal of Veterinary Research*. Vol.55, n°11. P1564–1569.

TRZECIAK MC., DENNINGER M., 2003. *L'hémostase en question*. BioMérieux. 184p. ISBN : 978-2-9514963-3-0

VALCHEV I., BINEV R., YORDANOVA V., 2008. Anticoagulant Rodenticide Intoxication in Animals - A review. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. Vol.32, n°4. p237–243.

VERMEER C., 1990. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *The Biochemical Journal*. Vol.266, n°3. p625–636. DOI :10.1042/bj2660625.

VERSTEEG HH., HEEMSKERK JW., LEVI M., REITSMA PH., 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*. Vol.93, n°1. p327–358. DOI:10.1152/physrev.00016.2011.

WALLIN R., WAJIH N., HUTSON SM., 2008. VKORC1: a warfarin-sensitive enzyme in vitamin K metabolism and biosynthesis of vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Vitamins and Hormones*. Vol.78. p227–246. DOI:10.1016/S0083-6729(07)00011-8.

WATZKA M., GEISEN C., BEVANS CG., SPOHN G., *et al.*, 2011. Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. Vol.9, n°1. p109–118. DOI:10.1111/j.1538-7836.2010.04095.x.

WOLBERG AS., ALEMAN MM., LEIDERMAN K., MACHLUS KR., 2012. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesthesia and Analgesia*. Vol.114, n°2. p275–285. DOI:10.1213/ANE.0b013e31823a088c.

ZETTERSTRÖM R., 2006. The discovery of antihemorrhagic vitamin and its impact on neonatal health. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*. Vol.95, n°6. p642–644. DOI:10.1080/08035250600719739.



## Annexes

### Annexe 1 : Attestation d'avis favorable au projet expérimental

<b><u>Revue Ethique d'un Projet d'utilisation d'animaux à des fins scientifiques</u></b> <b>Comité d'Ethique de VetAgro Sup n°18</b>
Numéro Comité d'Ethique : <b>1943_V2</b>  Titre du Projet : «Etude du polymorphisme du gène VKORC1 chez les bovins- Influence de l'exposition au férutenol».
Demandeur : Anna Albistur Responsable de la mise en œuvre en conformité avec l'autorisation : Véronique Lambert et Virginie Lattard Etablissement Utilisateur : Date de l'avis : 25/06/19  <input checked="" type="checkbox"/> Avis Favorable <input type="checkbox"/> Avis Favorable sous réserve de modification de la version proposée (version 2) <input type="checkbox"/> Avis Favorable sous condition d'apporter des réponses aux questions posées <input type="checkbox"/> Avis Non Favorable en l'état  <u>Commentaires</u> :  Les membres du Comité d'Ethique ont bien noté que les résultats ne sont pas transmis aux propriétaires des animaux parce qu'ils n'ont pas d'impact sur la santé animale. Pouvez-vous confirmer qu'à terme la détection de ce gène ne peut pas avoir un intérêt dans la sélection des Bovins ?

Signature du Président :

po/



*Attention : Dès réception de votre dossier en provenance du MESR, il vous sera demandé de faire parvenir au Ministère de la Recherche une version modifiée de votre projet, qui tiendra compte des demandes de modifications qui vous ont été demandées : précisions sur le nombre d'animaux, en particulier.*

**Annexe 2 : Liste des sujets de l'étude**

LabID	Nom élevage	Race	Numéro identification	Sexe
Vc22	ND	Corse	Vi 6	ND
Vc23	ND	Corse	Vi 7	ND
Vc24	ND	Corse	Vi 8	ND
Vc25	ND	Corse	Vi 9	ND
Vc26	ND	Corse	Vi 10	ND
Vc27	ND	Corse	Vi 11	ND
Vf 01	Mr Vacheron Luc	Charolaise	4242608502	F
Vf 02	Mr Vacheron Luc	Charolaise	4242608498	F
Vf 03	GAEC Michaud cheptel 42141216	Prim Holstein	1344	F
Vf 04	GAEC Michaud cheptel 42141216	Prim Holstein	2936	F
Vf 05	GAEC Michaud cheptel 42141216	Prim Holstein	7744	F
Vf 06	GAEC Michaud cheptel 42141216	Prim Holstein	9237	F
Vf 07	GAEC Michaud cheptel 42141216	Prim Holstein	0788	F
Vf 08	GAEC Michaud cheptel 42141216	Montbeliarde	4384	F
Vf 09	GAEC Michaud cheptel 42141216	Montbeliarde	9808	F
Vf 10	GAEC Michaud cheptel 42141216	Montbeliarde	6316	F
Vf 11	GAEC Michaud cheptel 42141216	Montbeliarde	9860	F
Vf 12	GAEC Michaud cheptel 42141216	Montbeliarde	6346	F
Vf 13	Mercier Clément	Charolaise	7122338716	F
Vf 14	Mercier Clément	Limousine	7122208829	M
Vf 15	Berthelier Dominique	Salers	6540	F
Vf 16	Berthelier Dominique	Salers	4854	F
Vf 17	GAEC Chartier	Aubrac	5823629715	F
Vf 18	Magnin Marc	Limousine	6950957728	F
Vf 19	Magnin Marc	Charolaise	4242754488	F
Vf 20	GAEC de la Rirole	Limousine	FR8131231911	F
Vf 21	GAEC de la Rirole	Limousine	FR8131629240	F
Vf 22	GAEC de la Rirole	Limousine	FR8132194661	F
Vf 23	GAEC de la Rirole	Charolaise	FR8131602967	F
Vf 24	EARL de la Condomine	Gasconne	FR3100017012	F
Vf 25	GAEC de Cruzigues	Gasconne	FR8131658321	F
Vf 26	GAEC de Cruzigues	Gasconne	FR8131658328	F
Vf 27	GAEC de Cruzigues	Gasconne	FR8131248292	F
Vf 28	GAEC de Cruzigues	Gasconne	FR8131888338	F
Vf 29	EARL de la Condomine	Aubrac	FR1215304801	F
Vf 30	EARL de la Condomine	Aubrac	FR1216302367	F
Vf 31	EARL de la Condomine	Aubrac	FR1216344945	F
Vf 32	GAEC les Gorges du Banquet	Aubrac	FR1213048450	F
Vf 33	GAEC du Suquet	Salers	FR1936022372	F
Vf 34	GAEC du Suquet	Salers	FR6357043835	F
Vf 35	GAEC du Suquet	Salers	FR6352648237	F
Vf 36	GAEC du Suquet	Salers	FR8131641916	F
Vf 37	GAEC du Suquet	Salers	FR1535159373	F

Vf 38	GAEC de Ladrech	Blonde d'Aquitaine	FR8160164681	F
Vf 39	GAEC de Ladrech	Blonde d'Aquitaine	FR8160155784	F
Vf 40	GAEC de Ladrech	Blonde d'Aquitaine	FR8160155789	F
Vf 41	GAEC de Ladrech	Blonde d'Aquitaine	FR8160155799	F
Vf 42	GAEC de Ladrech	Blonde d'Aquitaine	FR8128141411	F
Vf 43	Troupeau pédagogique ENVL	Montbeliarde	FR4242070856	F
Vf 44	GAEC La ferme Bazin (BAZIN Jean-Louis)	Montbeliarde	FR6951026141	F
Vf 45	GAEC de la croix blanche Rajat	Prim Holstein	FR4242713772	F
Vf 46	ND	Abondance	FR7402260580	F
Vf 47	ND	Abondance	FR7402636775	F
Vf 48	ND	Abondance	FR7402546597	F
Vf 49	ND	Abondance	FR7402628696	F
Vf 50	ND	Abondance	FR4702611652	F
Vf 51	ND	Abondance	Vi 1	F
Vf 52	ND	Abondance	Vi 2	F
Vf 53	ND	Abondance	Vi 3	F
Vf 54	ND	Abondance	Vi 4	F
Vf 55	ND	Abondance	Vi 5	F

### Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN génomique avec le kit "Nucleospin Blood QuickPure"

INRA - VAS USC 1233	Mode opératoire	Code du document : MO - BM - 004
	Extraction de l'ADN génomique à partir de sang. Kit « NucleoSpin Blood QuickPure » (M. Nagel)	Version : 0 Date : 10.05.02019 Page 1 sur 2

#### **Objet et domaine d'application :**

Extraction d'ADN génomique à partir de sang total (à défaut, à partir de plasma). Première étape pour de nombreuses expériences en biologie moléculaire.

#### **Document de référence :**

"Genomic DNA from blood – User Manual – NucleoSpin Blood QuickPure" - December 2015 / Rev.15  
Macherey Nagel / Référence du kit : **740569.250**

#### **Hygiène et sécurité :**

Certains réactifs du kit présentent des risques :

- Les tampons BQ1 contient de la guanidine hydrochloride et du sel chaotrope.
- La protéinase K peut être irritante.

De plus, de l'éthanol (96-100%) est également utilisé lors de ce protocole.

→ Donc, bien travailler avec blouse et gants et se conférer aux FDS.

#### **Principe du mode opératoire :**

Le principe consiste en 4 étapes :

- Lyser les cellules.
- Précipitation de l'ADN.
- Fixation spécifique des acides nucléiques dans une colonne de silice.
- Elution de l'ADN.

#### **Matériels nécessaires :**

Microtubes	Kit
Bain marie	Vortex
Centrifugeuse	Portoirs
Micropipettes	

#### **Réactifs nécessaires :**

Ethanol 96-100%

Eau ultrapure

Protéinase K (enzyme fournie par le kit, à stocker à -20°C après reconstitution)

#### **Contraintes du mode opératoire :**

Si possible, limiter le nombre d'échantillons à la capacité de la centrifugeuse.

#### **Mode opératoire :**

Au préalable :

S'assurer que le tampon BQ2 ainsi que la Protéinase K soient préparés comme indiqué dans la notice de Macherey-Nagel. Pour la protéinase K, prendre garde de la reconstituer sous une hotte et noter la date de reconstitution.

INRA - VAS USC 1233	<b>Mode opératoire</b>	Code du document : MO - BM - 004
	Extraction de l'ADN génomique à partir de sang. Kit « NucleoSpin Blood QuickPure » (M. Nagel)	Version : 0 Date : 10.05.02019 Page 2 sur 2

Pour l'extraction de l'ADNg:  
 Introduire 200µL de sang dans un microtube identifié.  
 Ajouter 25 µL de Protéinase K.  
 Ajouter 200µL de BQ1.  
 Vortexer fort pendant 10 à 20 secondes.  
 Incuber au bain-marie à 70°C pendant 10 à 15 minutes.

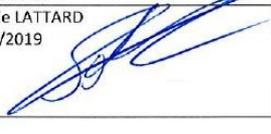
Ajouter 200µL d'éthanol à 96-100%.  
 Vortexer.

Transférer le contenu du tube eppendorf dans la colonne de silice identifiée.  
 Centrifuger pendant 1 minute à 11000g.  
 Vider le reliquat.  
 Ajouter 350µL de BQ2 dans la colonne de silice.  
 Centrifuger pendant 3 minutes à 11000g.

Récupérer la colonne de silice et jeter le reste à la poubelle.  
 Placer la colonne de silice dans un microtube identifié (pour conservation).  
 Ajouter 50µL d'eau ultrapure.  
 Attendre 1 minute à température ambiante.  
 Centrifuger pendant 1 minute à 11000g.  
 Retirer la colonne de silice et ne garder que le microtube contenant l'éluat d'ADNg.  
 Conserver l'ADNg extrait à +4°C (ou -20°C lorsque l'ADNg n'est plus utilisé).

**Annexes :**

Néant

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Abdessaïem HAMMED	Virginie LATTARD	Virginie LATTARD
Date :	30/04/2019	10/05/2019	10/05/2019
Visa :			

**Annexe 4 : Protocole de PCR et séquençage de VKORC1 chez la vache avec de l'Accuprime**

INRA - VAS USC 1233	Mode opératoire	Code du document : MO - BM - 009
	PCR et Séquençage de <i>Vkorc1</i> chez la vache avec de l'Accuprime	Version : 0 Date : 17 janvier 2020 Page 1 sur 4

**Objet et domaine d'application :**

Déterminer par PCR la séquence nucléotidique de l'ensemble du gène *Vkorc1* chez la vache (*Bos taurus*). Pour information, chez la vache, *Vkorc1* fait environ 2000 pb. L'amplification du gène se fera donc en 2 PCR de 1500 pb dont les amplicons se chevauchent.

**Document de référence :** Aucun

**Hygiène et sécurité :**

Le mélange de la PCR est réalisé en labo G.

La migration des amplicons par électrophorèse sur gel agarose est réalisée dans le labo E.

Le port de la blouse est obligatoire dans chacune des pièces. Les blouses ne doivent pas être sorties du laboratoire G.

Les réactifs utilisés ne présentent pas de réel risque pour la santé vis-à-vis des utilisateurs.

Le matériel des paillasse du Labo G ne doit pas être déplacé (risque de contamination).

Veiller à ne pas contaminer la paillasse des mix (paillasse G2).

⚠ Ne surtout pas ouvrir un tube d'ADN amplifié dans le Labo G. ⚠

Veiller à travailler avec une blouse, des gants et se conférer aux Fiches Données de Sécurité (FDS).

**Principe du mode opératoire :**

Le principe consiste en 3 étapes :

- 2 PCR pour amplifier tout le gène.
- Electrophorèse sur gel agarose pour vérifier la présence de l'amplicon.
- Séquençage: doser et envoyer les amplicons avec l'amorce de séquençage à utiliser.

**Matériels nécessaires :**

Micotubes	Mini-centrifugeuse
Thermocycleur	Vortex
Portoirs réfrigérés	

**Réactifs nécessaires :**

- AccuPrime (Invitrogen, ref. 12346086)	-20°C
- Amorces spécifiques (Eurogentec)	-20°C
Mix A : BosVKR-A-F :	3' AGC-GGG-CGT-GGT-CAA-ATC 5'.
Mix B : BosVKR-A-R :	3' CTC-AGT-GAT-GCG-CAG-TTA-GTT-G 5'.
Mix B : BosVKR-B-F :	3' GGA-GAT-TTA-AGG-GTC-CAA-GGC-A 5'.
Mix B : BosVKR-B-R :	3' GTA-GCA-AAC-TGT-GGC-ATG-TCT-G 5'.
- Eau Milli Q	-20°C

**Contraintes du mode opératoire :**

Penser à réserver un créneau pour le thermocycleur nécessaire pour cette expérience.

INRA - VAS USC 1233	<b>Mode opératoire</b>	Code du document : MO - BM - 009
	<b>PCR et Séquençage de <i>Vkorc1</i> chez la vache          avec de l'Accuprime</b>	Version : 0 Date : 17 janvier 2020 Page 2 sur 4

**Mode opératoire :**

Toujours bien nettoyer les paillasse du Labo G avec du DNAaway, avant et après utilisation.

1. Paillasse G2 : Préparer les 2 mix comme ci-dessous :

Mix A pour n réactions (n = nb d'échantillons + témoins) :

Eau :	18,3 µl x (n+1)	} 23µl/ échantillon + 2µl d'ADNg.
Tampon II (10X) :	2,5 µl x (n+1)	
BosVKR-A-F (10 pmol/µl) :	1 µl x (n+1)	
BosVKR-A-R (10 pmol/µl) :	1 µl x (n+1)	
Enzyme Accuprime :	0,2 µl x (n+1)	

Mix B pour n réactions (n = nb d'échantillons + témoins) :

Eau :	18,3 µl x (n+1)	} 23µl/ échantillon + 2µl d'ADNg.
Tampon II (10X):	2,5 µl x (n+1)	
BosVKR-B-F (10 pmol/µl) :	1 µl x (n+1)	
BosVKR-B-R (10 pmol/µl) :	1 µl x (n+1)	
Enzyme Accuprime :	0,2 µl x (n+1)	

2. Distribuer le mix dans chaque microtubes **clairement identifiés**.
3. Allumer le thermocycleur et lancer le programme de PCR (BM009)
4. Transférer les microtubes sur la paillasse G1 et ajouter l'ADNg
5. Placer les échantillons dans le thermocycleur et démarrer le programme BM009.

Détail du programme BM009 : (Durée : 2h15 environ)  
 Lid : 105°C / Hold 94°C

94°C durant 3 minutes

94°C durant 20 secondes	} x 40 cycles
60°C durant 20 secondes	
68°C durant 90 secondes	

68°C durant 10 minutes  
 10°C Hold on.

6. Faire migrer les produits de PCR sur un gel 1,5% agarose (cf. MO associé)
7. Déterminer la concentration des amplicons (cf. MO associé)
8. Envoyer pour séquençage (cf. MO associé)

INRA - VAS USC 1233	Mode opératoire	Code du document : MO - BM - 009
	PCR et Séquençage de <i>Vkorc1</i> chez la vache avec de l'Accuprime	Version : 0 Date : 17 janvier 2020 Page 3 sur 4

**Annexe 1 : *Vkorc1* – *Bos taurus***

TCTGGGTCTCTTGCACCTCTGCATCGGCAGGCAGATTGTTTACCACTGCGCCACGCGGAAAGCCTATCCCGGGTGA  
GATGGCTCGTTAATAAATACTGTGTGAAAGGGAGAGGTCAGCTAGCCCGTCAAAGCCTTGAATGGAGGGACTG  
TTGGGTTGATCTGGGCTCAGGTTTCGCCAGGTGGCGCCACAATAGAACAGAGGTTAGGATACTGTCCAGGATATGG  
CGAAGCTGATGGAGCTGGGAATGTAGGAGAGAGACGTAGATATCGGCCAGCAAGAGGCGCTGGTGCAGCAGGAA  
GGAATGGCTGGGCAAAGTACGCGGATTGGAGGCTATGCTGTAGATAATTTTAGGGAAAACGCTTGGTCTTGATG  
AGATCGCAGTATGCCCTGGATTCCCTGATCCGCTGATCTAGTTCAGGATTCTCCAAAGTTAAACAGGGCTTGCA  
CTAGAGTAAACGCTATATATTGTTAGCCCGATTAATATAACTTGTAAAACCTCCGGAGATTTTATTATCCTTGAGGCAC  
TGCAGCCGCCCGACTACAATCCCATCATGCCTGGCAGGCCGTCAAATCCGTAATAACCAAGTCCCTTAATCGGTT  
TTCCAGTCCCAGCATTCTCAACTGTTTTCTACCGCGGCAACACGCTTGCCAAATCATAGGAACAACCAATTAGATC  
AGGGAGTGCAGACCCAGTAGGCCAATCGTTCAGTCAGAGGGGCGGG **AGCGGGCGTGGTCAAAT**CCGGCCCGCC  
CCTGCCCGTGGCCAGTTAGTTTTCCGGCTGAGGCTTCTTCGGGCAGGACCTGAAGAC**ATGGGGCGTACTCTGGCGG**  
**AGTCCGGGTGGGTGCGGCTCGCGCTCTGCCTCGCGGGTTT**AGTGCTCTCTCT**ACGCGCTGCACGTGAAGGGC**  
**GCGCGCGCCCGGACCGGGATTACCGCGCGCTCTGCGACGTGGGCACTGCCATCAGCTGTTCCGCGCTTCTCTCT**  
**CCAGG**TACACGGGGAGTGGAGGGCTTGGGGGACCGCTGCTCGTGGGAGCGGTGCATGGGGTCCAGGTGTGCATG  
GCAGCCAGGCTGCCAGATCAATCGGGGTTGGGGTCCCGGGGAGCGGACGCGCGGGACCAGGCTGCTCAAGGG  
AGCGTTCCCTGGAGAAACGAGTGTGCCGAGATAGGAGTGTGGGCTAAGGGGACAGATAGTTCTGGGGACTGG  
GGTTATTGAGGGAATACATGTGAATCCTGATAACAAGGAATAACAGTGACCGGGCAGGACACAGGGAGATAGGG  
TCGAGTGTAGGAACTGATTATGGTCTTAAGGATGGGCTGCTGGCGACAAGGTGGCCAGGCTGTTTATGCTTGA  
GGATACAGGGTTTGTGGGATGACCTGAGACAGAAGAGGGAAGAGTGTGGAGGGGGCGCT **GGAGATTTAAGGGT**  
**CAAGGC**AGAGAGATTCTGTCTTGGTTTCCAGTCTCTGGTAACTCTGTAAAATAAGATGAAGGGTTATACGCACCTT  
ACCACCCTAGGATTTATTGAAAGTCTAGGATGAAAAGAGAGCCTATGGGAGAGCCATGGCCAGGCTGACCTGGG  
GATGGGGGAGGACAGGGGCACTGACATGGAATCCTGCCTTGGCCAAAGAAAGGCTATGCTCGGAGGCTACTGACC  
CTTGGACTCATGTAGGGGTTGGGGAAAGGGTGAATGAGATGGGAAAGGACGCCAACTGGCTTCTTGGAAATAACCA  
GGATAGGGCTCAGGGCACTGAGTTGATACTCCTAAGTCCCTCCCTCCACCAGGTGTGGGCTTCCCTGGTAGC  
TCAGACAGTAAAGCGTCTGCCTACAATGAGAGAGACCCGGGTTGATCCCTGAGTTGGGAAGATCCCTGGAGAAG  
GAAATGGCAACCCACTCCAGTATTCATGCCAGGTTCCGAGGAGCTGGTGGGCTACAGTCCATGGGGTACAGAGT  
CGTACACGACTGAGTGACTTCACTTACTTCCACCAGGT **GGGGCCGTGGCTTCGGACTGGTGGAAACAGTGTGGG**  
**CAAAGACAGCATCTCAATCAATCAACAGCATATTTGGTTGCATCTTACACACTGCAGTTGTTGTTAGGT**GAGT  
GGCCTCACCTCTTGACAGCCCCCTTCCCTCTTGGCCAGCCAGCCGAAACTCTTGACGTCTTGGTGACCCAGAC  
ATCTGATGGC **CAACTAACTGCGCATACTGAG**CACCAAGGAGGTGGGAATTTATAGGGGCTTACTGTGAGAACC  
ATAGGGCCCTTAGAGATTTCCAGGAGCCCGGTTTTCTAGAAAAGACTCCCTTCTGGGGAAACCAAGGGTTGCTG  
TCTCTCATCTACATAGAGCTCAGCAGGAAAATCACTATTTTGGTCCAGGGATCGTTGAACACGTAGGAGAACCA  
GGGCTTGGTGGAGCCCTGTCTGAGCTGCTATTTAGAGGCTCTTCCCAAGTAGCCCTGCTGTCTGGGCGGCACC  
ATGGAGTCATGGCATGTTCTAGTAATGGCTAGTTGCCAAAGCCTACATCTGCCCTTTCTGCTTACAGGCT **GCCTG**  
**CAGGGCCGCTGGGCATCTGTTCTACTGAGGTTGAGTTGCTGGTGTCTAGCTGGTTCTGTGTACGCTGGCCTGGA**  
**TCTGTTCTCGTCTATGATTTCTGCATCGTTTGCATCACTACTTATGCCATCAATGTGGGCTGACGGTGCTCA**  
**GTTTCCGGGAGGTCCAGGGACCCAGGGCAAGGTCAAGGGGCACTGA**GCCCTCACCCAAAGCCAGAGTGACCTTT  
GCCAAGAAGGCCAGTCTGGGCTTGGAAAGTCTGCACGTTGCCCTGCCATACTCCGACACAGGACAATGGAC  
**CAGACATGCCACAGTTTGTAC**CTTAGTGCCTCTGTTCTGTTCCAAAGCTGATTTCAAAGCTCCTGCTGTTGCTCC  
AGGAGGGAAGTTTCGGAGCAATAAAATTTCTTAAATAAA

INRA - VAS USC 1233	<b>Mode opératoire</b>	Code du document : MO - BM - 009
	<b>PCR et Séquençage de <i>Vkorc1</i> chez la vache          avec de l'Accuprime</b>	Version : 0 Date : 17 janvier 2020 Page 4 sur 4

**Légende :**

- Les exons sont représentés en **rouge/gras/souligné**

- Amorces de PCR :

Pour PCR Mix A → 1497 pb

BosVKR-A-F : 5' **AGCGGGCGTGGTCAAATC** 3'

BosVKR-A-R : 5' **CTCAGTGATGCGCAGTTAGTTG** 3'

Pour PCR Mix B → 1490 pb

BosVKR-B-F : 5' **GGAGATTTAAGGGTCCAAGGCA** 3'

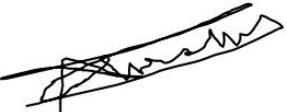
BosVKR-B-R : 5' **GTAGCAAACGTGGCATGCTG** 3'

- Amorces de séquençage :

Pour l'exon 1 = amorce de PCR « BosVKR-A-F »

Pour l'exon 2 = amorce de PCR « BosVKR-A-R »

Pour l'exon 3 = amorce de PCR « BosVKR-B-R »

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	HAMMED Abdessalem	Anna ALBISTUR	LATTARD Virginie
Date :	17 janvier 2020	28/05/2020	
Visa :			

Ce document est la propriété exclusive de l'USC 1233. Toute reproduction non autorisée par le directeur de l'unité pourra entraîner des poursuites.

<b>INRA - VAS USC 1233</b> 	<b>MODE OPERATOIRE</b>	<b>Code du document :</b> <b>MO-0006</b>
	Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	<b>Version : 2</b> Date : 01/04/2016 Page n° 1 de 3

### Objet et domaine d'application

Faire migrer un fragment d'ADN sur gel d'agarose.

Plusieurs buts possibles :

- Vérifier la présence du fragment d'ADN
- Vérifier spécifiquement l'amplification ou la digestion du fragment d'ADN
- Séparer un fragment d'ADN pour le purifier, ...

### Documents de référence

Aucun

### Hygiène et sécurité

Certains réactifs présentent des risques :

- Le **tampon TBE** contient du **Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane** (FDS 0020), de l'**acide borique** (FDS-0022) et de l'**EDTA** (FDS-0021)
- Le **SafeView** (FDS-0023)

Il est impératif de travailler avec **blouse** et **gants en nitrile (bleu)** et se conférer au FDS.

Pour la révélation grâce à **la lampe UV**, bien rester derrière la vitre.

### Principe de la méthode

Le principe consiste en 3 étapes :

- Préparer un gel d'agarose.
- Faire migrer l'échantillon.
- Visualiser la migration sous UV.

### Matériels nécessaires

- Matériel pour gel : peigne, socle, portoir (E-2)
- Parafilm (E-2)
- Cuve d'électrophorèse (E-F1)
- Lampe UV.
- Appareil à micro-onde
- Becher

### Réactifs (chimiques et biologiques)

- Tampon TBE 0,5X (E-F1)
- Marqueur de taille (« ladder ») (E-F1)
- Loading dye 6X (E-F1)
- SafeView au 1/10 000<sup>e</sup> (intercalent d'ADN) (E-F1)
- Agarose (H-2)

Ce document est la propriété exclusive de l'USC 1233. Toute reproduction non autorisée par le directeur de l'unité pourra entraîner des poursuites.

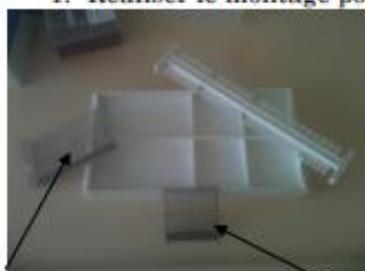
<b>INRA - VAS USC 1233</b> 	<b>MODE OPERATOIRE</b>	Code du document : <b>MO-0006</b>
	Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	<b>Version : 2</b> Date : 01/04/2016 Page n° 2 de 3

### Contraintes de la méthode

Aucune contrainte apparente

### Mode opératoire

1. Réaliser le montage pour pouvoir couler le gel.



Socle pour grand gel (17 ou 12 puits)



Socle pour petit gel (8 ou 6 puits)

2. Faire le gel d'agarose. Plus le fragment d'ADN à faire migrer est de petite taille plus les mailles du gel doivent être serrées et donc plus la concentration en agarose doit être importante.

Pour des fragments de 100 à 700 paires de bases : gel 1,5%.

Pour des fragments de 700 à 2000 paires de bases : gel 1%.

	Petit socle (15 mL)	Grand socle (30 mL)
1%	Agarose : 0.15g TBE 0.5X : 15mL SafeView : 1.5µL	Agarose : 0.3g TBE 0.5X : 30mL SafeView : 3µL
1.5%	Agarose : 0.225g TBE 0.5X : 15mL SafeView : 1.5µL	Agarose : 0.45g TBE 0.5X : 30mL SafeView : 3µL

3. Dans un bécher mettre le TBE ainsi que l'agarose et mettre le tout dans l'appareil à micro-ondes jusqu'à ébullition.
4. Attendre que ça refroidisse puis ajouter le SafeView et remuer avec le cône.
5. Verser le gel dans sa cassette et le laisser se solidifier durant au moins 30 minutes.

Ce document est la propriété exclusive de l'USC 1233. Toute reproduction non autorisée par le directeur de l'unité pourra entraîner des poursuites.

<b>INRA - VAS</b> <b>USC 1233</b> 	<b>MODE OPERATOIRE</b>	Code du document : <b>MO-0006</b>
	Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	<b>Version : 2</b> Date : 01/04/2016 Page n° 3 de 3

6. Une fois le gel solidifier, le mettre dans la cuve de migration.



7. Préparation des échantillons :

Déposer sur le parafilm 1 $\mu$ l de loading dye (6X) et 5 $\mu$ l d'échantillon.  
Homogénéiser par aspiration-refoulement.

8. Déposer l'échantillon dans le puits du gel

9. Une fois tous les échantillons déposés, faire migrer à 100V durant environ 20 à 30 minutes. (Suivre le front de migration).

10. Visualiser la migration sous ultra-violets.



	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Sébastien Lefebvre	Abdessalem HAMMED	
Date :	01 / 04 / 2016	01 / 04 / 2016	
Visa :			

Ce document est la propriété exclusive de l'USC 1233. Toute reproduction non autorisée par le directeur de l'unité pourra entraîner des poursuites.

Annexe 6 : Classification des acides aminés

## Légende

Structure Chimique  
code à une lettre

NOM **A**  
code à 3 lettres  
codons

● ALIPHATIQUE

● ACIDE

● HYDROXYLÉ

○ ESSENTIEL

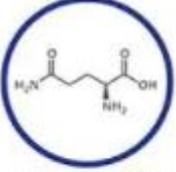
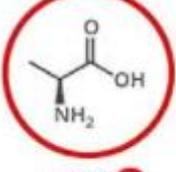
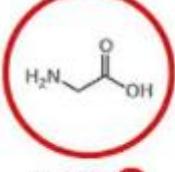
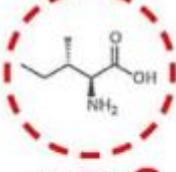
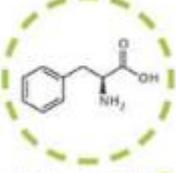
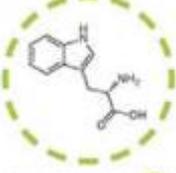
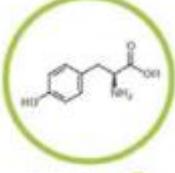
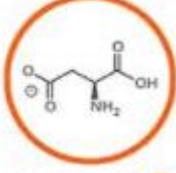
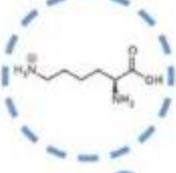
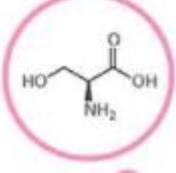
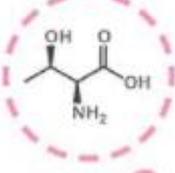
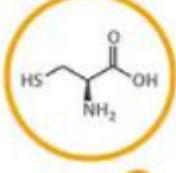
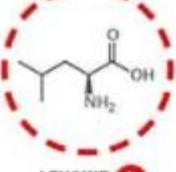
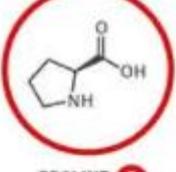
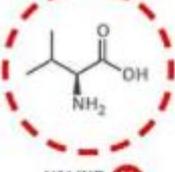
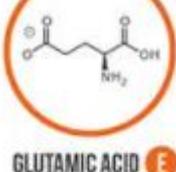
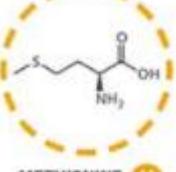
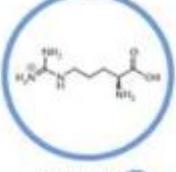
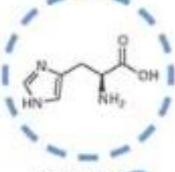
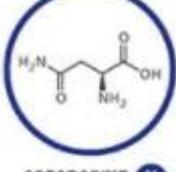
● AROMATIQUE

● BASIQUE

○ NON ESSENTIEL

● SOUFRE

● AMIDE

 <b>GLUTAMINE</b> <b>Q</b> <i>gln</i>	 <b>ALANINE</b> <b>A</b> <i>ala</i>	 <b>GLYCINE</b> <b>G</b> <i>gly</i>	 <b>ISOLEUCINE</b> <b>I</b> <i>ile</i>
 <b>PHENYLALANINE</b> <b>F</b> <i>phe</i>	 <b>TRYPTOPHAN</b> <b>W</b> <i>trp</i>	 <b>TYROSINE</b> <b>Y</b> <i>tyr</i>	 <b>ASPARTIC ACID</b> <b>D</b> <i>asp</i>
 <b>LYSINE</b> <b>K</b> <i>lys</i>	 <b>SERINE</b> <b>S</b> <i>ser</i>	 <b>THREONINE</b> <b>T</b> <i>thr</i>	 <b>CYSTEINE</b> <b>C</b> <i>cys</i>
 <b>LEUCINE</b> <b>L</b> <i>leu</i>	 <b>PROLINE</b> <b>P</b> <i>pro</i>	 <b>VALINE</b> <b>V</b> <i>val</i>	 <b>GLUTAMIC ACID</b> <b>E</b> <i>glu</i>
 <b>METHIONINE</b> <b>M</b> <i>met</i>	 <b>ARGININE</b> <b>R</b> <i>arg</i>	 <b>HISTIDINE</b> <b>H</b> <i>his</i>	 <b>ASPARAGINE</b> <b>N</b> <i>asn</i>

**Annexe 7 : Traduction des codons de nucléotides en acide aminés**

		NUCLÉOTIDE 2 <sup>ème</sup> POSITION					
		U	C	A	G		
NUCLÉOTIDE 1 <sup>ère</sup> POSITION	U	UUU } phényl- UUC } alanine UUA } leucine UUG }	UCU } UCC } sérine UCA } UCG }	UAU } tyrosine UAC } UAA } non-sens UAG }	UGU } cystéine UGC } UGA } non-sens UGG } tryptophane	U C A G	
	C	CUU } CUC } leucine CUA } CUG }	CCU } CCC } proline CCA } CCG }	CAU } histidine CAC } CAA } glutamine CAG }	CGU } CGC } arginine CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } isoleucine AUA } AUG } méthionine	ACU } ACC } thréonine ACA } ACG }	AAU } asparagine AAC } AAA } lysine AAG }	AGU } sérine AGC } AGA } arginine AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } valine GUA } GUG }	GCU } GCC } alanine GCA } GCG }	GAU } acide GAC } aspartique GAA } acide GAG } glutamique	GGU } GGC } glycine GGA } GGG }	U C A G	
						NUCLÉOTIDE 3 <sup>ème</sup> POSITION	



# POLYMORPHISME DU GENE *VKORC1* CHEZ *BOS TAURUS* INFLUENCE DE L'EXPOSITION AU FÉRULÉNOL

Auteur

---

ALBISTUR Anna

Résumé

---

De nombreuses études ont été consacrées à la protéine Vitamine K époxyde réductase sous-unité 1 (*VKORC1*) chez l'Homme et les rongeurs sauvages. Cette protéine est impliquée dans le cycle de la vitamine K, elle permet notamment le recyclage de la vitamine K, permettant l'activation des protéines vitamine K-dépendantes. Ainsi la protéine *VKORC1* joue un rôle primordial dans de nombreuses fonctions biologiques (calcification, inflammation, coagulation). Les molécules dites anti-coagulantes « anti-vitamine K » (AVK) possèdent un mécanisme d'action agissant sur la protéine *VKORC1*. Leurs utilisations diverses ont montré que les êtres vivants (principalement l'Homme et les rongeurs) présentent des sensibilités différentes à ces molécules qui s'expliquent, pour certaines, par un polymorphisme du gène *VKORC1* et son impact sur la conformation de la protéine.

Le féruléol, synthétisé par *Ferula sp.*, est un AVK connu pour provoquer un syndrome hémorragique appelé « férulose », pouvant aller jusqu'à la mort en cas de consommation continue. Ce syndrome a été décrit chez de nombreuses espèces (bovins, porcs, petits ruminants et chevaux), mais pas chez les bovins de race Corse, malgré une importante concentration plasmatique en féruléol. C'est dans ce contexte que le polymorphisme du gène *VKORC1* a été étudié chez *Bos taurus*. Dans cette étude, le séquençage d'ADN de 61 échantillons de bovins de 10 races différentes a permis de révéler l'existence de deux variants SNP non silencieux du gène *VKORC1* chez les bovins corses. Une relation de causalité entre la mutation p.Ser57Cys et la moindre sensibilité au féruléol est suspectée, l'impact biologique de ces variants sur le fonctionnement enzymatique de *VKORC1* serait à déterminer.

Mots-clés

---

*VKORC1*, Féruléol, Anticoagulants, Polymorphisme, Vaches corses

Jury

---

Président du jury	:	<b>Pr</b>	<b>CALENDER Alain</b>
Directeur de thèse	:	<b>Dr</b>	<b>LAMBERT Véronique</b>
1er assesseur	:	<b>Dr</b>	<b>LAMBERT Véronique</b>
2ème assesseur	:	<b>Dr</b>	<b>CHETOT Thomas</b>
Membre invité	:	<b>M.</b>	<b>HAMMED Abdessalem</b>