



Recherche, développement et innovation sur la faune sauvage

25 Rue de la Grette
25000 BESANCON - France

Contact : Mickaël Sage, expertises vertébrés terrestres, transfert de contaminants
Tel : +33 (0)6 33 07 04 98 - Fax : +33 (0)9 58 29 54 99
Email : mickael.sage@faune-innov.fr

Evaluation de l'exposition du Busard de Maillard (*Circus maillardi*) aux rodenticides sur l'île de la Réunion

Travaux écotoxicologiques réalisés entre 2015 et 2019

Rapport de synthèse

3 octobre 2019

Destinataire :



SEOR

Société d'Etude Ornithologique de la Réunion

François Xavier Couzi (Directeur)

13 ruelle des Orchidées
97440 Saint-André

Partenariat :



VetAgro Sup
Campus Vétérinaire de Lyon



Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du programme PROGRAMME FEDER - ECOPAP 2016 - 2019 « Ecologie et Conservation du Papangue » porté par la Société d'Etudes Ornithologiques de la Réunion.

Les financements ont été assurés par :

- La Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de La Réunion.
- L'union Européenne
- Les Fonds européen de développement régional FeDER
- Electricité De France
- Tereos Sucre Océan Indien



Ces travaux reposent également sur un investissement et un autofinancement important des différents partenaires (élaboration des protocoles, réalisation des prélèvements de terrain, analyses de laboratoire, interprétation et discussion des résultats).

Sage, M. (2019) Evaluation de l'exposition du Busard de Maillard (*Circus maillardi*) aux rodenticides sur l'île de la Réunion - Travaux écotoxicologiques réalisés entre 2015 et 2019 - Rapport de synthèse. Destinataire : Société d'Etude Ornithologique de la Réunion - SEOR. 102pp.

Date : 3 octobre 2019

Rédaction : Mickaël Sage – Faune INNOV'

Relecture : Steve Augiron – SEOR

Isabelle Fourel et Virginie Lattard – VetAgro Sup Lyon

1 SOMMAIRE

1	Sommaire.....	3
2	Partenaires.....	8
3	Liste des abréviations.....	9
4	Introduction générale.....	10
4.1	Le Busard de Maillard, une espèce classée « en danger d'extinction ».....	10
4.2	Parmi les causes suspectées de mortalité du busard : son exposition aux rodenticides	10
4.3	Les rongeurs, leurs implications agro-économique, environnementales et sanitaires à l'échelle de l'île.	10
4.4	Le contrôle des populations de rongeurs sur l'île	11
4.4.1	Modalités de traitement.....	11
4.4.2	Implications écotoxicologiques.....	12
4.4.3	Résistance des rongeurs aux substances actives	12
5	Objectifs généraux.....	14
5.1	Rongeurs - Axe 1 : Exposition des rongeurs après un traitement rodenticide en canne à sucre - écotoxicologie et résistance.....	14
5.2	Rongeurs - Axe 2 : Exposition aux rodenticides à une échelle spatiale large sur 6 sites différents, d'une des espèces de rongeur cible : le Rat noir	14
5.3	Busard de Maillard - Axe 1 : Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard retrouvés morts en nature ou accueillis affaiblis puis morts en centre de soin (mesure des résidus hépatiques).....	15
5.4	Busard de Maillard - Axe 2 : Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard accueillis vivants en centre de soin ou prélevés en nature (mesure des résidus sanguins).	15
	Rongeurs - Axe 1 : Exposition des rongeurs cibles après un traitement rodenticide en canne à sucre – écotoxicologie et résistance	16
1	Objectifs et contexte de l'étude.....	18
1.1	Objectifs.....	18
1.2	Contexte	18
2	Méthodologie.....	19

2.1	Expérimentation en nature	19
2.1.1	Calendrier	19
2.1.2	Site d'étude	19
2.1.3	Traitement rodenticide.....	21
2.1.4	Persistance des appâts et de la substance active en nature	21
2.1.5	Capture et échantillonnage de rongeurs.....	22
2.2	Analyses en laboratoire.....	24
2.2.1	Prélèvements des différents tissus.....	24
2.2.2	Dosage des Anticoagulants Anti Vitamine K.....	24
2.2.3	Génotypage résistance	25
2.3	Analyses des données	25
3	Résultats	26
3.1	Persistance des appâts en nature.....	26
3.2	Persistance de la substance active dans les appâts	27
3.3	Espèces capturées	28
3.3.1	Etude préliminaire (novembre 2015)	28
3.3.2	Etude principale (février – mars 2016).....	29
3.4	Exposition des rongeurs aux rodenticides	31
3.4.1	Etude préliminaire (novembre 2015)	31
3.4.2	Etude principale (février – mars 2016).....	31
3.5	Cinétique d'exposition des rongeurs après traitement.....	32
3.6	Dispersion spatiale des rongeurs après traitement.....	34
3.7	Résistance aux rodenticides	35
3.7.1	Etude préliminaire (novembre 2015)	35
3.7.2	Etude principale (février - mars 2016)	35
3.8	Exposition des espèces non cibles (crapauds).....	37
4	Discussion	38
4.1	Persistance des appâts en nature.....	38
4.2	Persistance de la substance active dans les appâts	38
4.3	Densités de rongeurs et efficacité de capture	39
4.4	Exposition des rongeurs cibles – cinétique et dispersion spatiale	40
4.5	Résistance des espèces cibles	41
4.6	Exposition des espèces non cibles (crapauds).....	42
4.7	Implications pour le Busard de Maillard.....	42
4.7.1	Evolution des densités de rongeurs après traitement.	42
4.7.2	Accessibilité des proies	43
4.7.3	Distribution des AVKs dans les tissus	43
4.7.4	Simulation d'exposition pour le Busard de Maillard et évaluation du risque	44

5 Conclusion et perspectives	45
 Rongeurs - Axe 2 : Exposition aux rodenticides à une échelle spatiale large sur 6 sites différents, d'une des espèces de rongeur cible : le Rat noir.....	
1 Objectif et contexte de l'étude.....	48
1.1 Objectif	48
1.2 Contexte	48
2 Methodologie.....	48
2.1 Sites d'étude et protocole d'échantillonnage	48
2.2 Analyses toxicologiques.....	49
3 Résultats.....	50
4 Discussion.....	52
4.1 Concentrations mesurées vs signes cliniques.....	52
4.2 Lien entre exposition et caractéristiques des sites d'étude.....	53
4.3 Implication pour l'exposition du Busard de Maillard.....	53
4.4 Espèce étudiée et perspectives - espèces cibles / résistance	54
 Busard de Maillard - Axe 1 : Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard retrouvés morts en nature ou accueillis affaiblis puis morts en centre de soin (mesures des résidus hépatiques).....	
1 Objectifs et contexte	57
1.1 Objectifs.....	57
1.2 Contexte	57
2 Méthodologie.....	58
2.1 Collecte des échantillons	58
2.2 Analyses toxicologiques.....	59
2.3 Analyses statistiques.....	59
2.3.1 Comparaisons des concentrations mesurées aux données toxicologiques connues	59
2.3.2 Tendances temporelles	60

2.3.3	Tendances spatiales	60
2.3.4	Lien éventuel entre exposition des busards, composition paysagère et densités de couples reproducteurs	60
3	Résultat.....	61
3.1	Proportion et nombre de Busards de Maillard exposés aux ARs	62
3.1.1	Influence du sexe et de l'âge des individus	62
3.1.2	Tendances temporelles	62
3.1.3	Variations spatiales	63
3.2	Concentrations mesurées dans le foie	63
3.2.1	Tendances temporelles	64
3.2.2	Variations spatiales	64
3.3	Cas potentiels d'empoisonnement (concentrations > 100 ng/g)	66
3.3.1	Tendances temporelles	66
3.3.2	Variations spatiales	67
3.4	Lien éventuel entre exposition des busards, composition paysagère et densité de couples reproducteurs.	68
4	Discussion.....	68
4.1	Exposition du Busard de Maillard aux rodenticides en comparaison aux données connues pour les rapaces continentaux	68
4.1.1	Une collecte des animaux affaiblis ou des cadavres opportunistes	68
4.1.2	Malgré cela, une exposition aux rodenticides AVKs sans équivoque.....	69
4.1.3	Une proportion d'animaux multi-exposés très importante	70
4.2	Composition paysagère et exposition du busard aux rodenticides AVKs.....	70
4.2.1	Proximité avec les zones urbanisées	70
4.2.2	Proximité avec les zones de culture, notamment de canne à sucre.....	71
4.2.3	Densités de couples nicheurs et exposition aux rodenticides	71
4.2.4	Vers une meilleure collecte d'information sur le lieu précis de découverte des animaux	72
4.3	Exposition du Busard de Maillard aux rodenticides AVKs et conséquences pour la population	72
5	Conclusion.....	73
Busard de Maillard - Axe 2 : Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard accueillis vivants en centre de soin ou prélevés en nature (mesures des résidus sanguins).		74
1	Objectifs et contexte	75

1.1	Objectifs.....	75
1.2	Contexte	76
2	Méthodologie.....	76
2.1	Analyses toxicologiques.....	76
2.2	Origine des animaux prélevés.....	76
2.2.1	Animaux accueillis en centre de soin.....	76
2.2.2	Animaux prélevés en milieu naturel.....	77
3	Résultat.....	78
3.1.1	Animaux accueillis en centre de soin.....	78
3.1.2	Animaux prélevés en milieu naturel.....	79
4	Discussion.....	80
4.1	Concentrations mesurées vs signes cliniques.....	83
4.2	Comparaison entre substances actives.....	85
4.3	Nombre d'individus exposés	86
4.4	Comparaison à d'autres études réalisées sur rapaces en nature	87
	Pistes de réflexions nécessaires à la définition d'un plan de contrôle des populations de rongeurs sur l'île de la Réunion	88
1	Efficacité des opérations de contrôle de rongeurs.....	89
2	Risques écotoxicologiques pour la faune non cible, dont le Busard de Maillard...89	
3	Pistes parfois proposées sur l'utilisation d'autres substances actives rodenticides	90
4	Perspectives proposées	91
4.1	Définition d'un plan de lutte intégrée à l'échelle de l'île	91
4.2	Initier les modifications réglementaires nécessaires au contrôle des populations de rats et souris dans le contexte agricole des territoires d'outre-mer.....	92
	Références citées.....	94

2 PARTENAIRES

Les études présentées dans ce rapport ont été réalisées dans le cadre d'un partenariat entre les structures suivantes :



- **Société d'Etude Ornithologique de la Réunion** (SEOR) sous la direction de François Xavier Couzi et avec l'assistance scientifique et technique de Steve Augiron (Dr.) et Pierrick Ferret.



- **VetAgro Sup Lyon** - USC 1233 Rongeurs sauvages sous la direction d'Etienne Benoit (Pr.) et avec l'assistance scientifique et technique d'Isabelle Fourel (Dr.) et Virginie Lattard (Dr.).



- **Université de Bourgogne Franche-Comté**, UMR 6249 CNRS-UFC Chrono Environnement avec l'assistance scientifique de Michael Coeurdassier (Dr.) et d'Anne-Sophie Pingon (Stagiaire Master 2 SEOR – Université de Franche-Comté).



- **Université de la Réunion**, UMR PIMIT Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical CNRS 9192, INSERM 1187, IRD 24 avec l'assistance scientifique de Pablo Tortosa (Dr.).



- **Faune INNOV'** - Recherche, développement et innovation sur la faune sauvage, sous la direction de Mickaël Sage (Dr.).

3 LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARs	Anticoagulants Rodenticides (sous entendu AVKs Rodenticides)
AVKs	Anticoagulants Anti-vitamine K
CMR	Capture-Marquage-Recapture
DL₅₀	Dose létale pour 50% de la population exposée (DL ₁₀₀ pour 100%)
FDGDON	Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles
LC MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppb	Part per billion (1 ppb = 10 ⁻⁹ g/g)
ppm	Part per million (1 ppm = 10 ⁻⁶ g/g)
SEOR	Société d'Etude Ornithologique de la Réunion
VKORC	Activité vkorc
VKORC1	Enzyme Vitamine K hypoxyde réductase
vkorc1	Gène codant pour la vitamine K époxyde réductase

Principales unités utilisées :

1 mg/L = 1 ppm = 1 000 ng/ml = 1 000 µg/L = 1 000 ppb

1 mg/kg = 1 ppm = 1 000 ng/g = 1 000 µg/kg = 1 000 ppb

4 INTRODUCTION GENERALE

4.1 *Le Busard de Maillard, une espèce classée « en danger d'extinction »*

Parmi les onze espèces d'oiseaux endémiques présentes sur l'île de la Réunion, cinq sont menacées d'extinction (Moncorps *et al.* 2010 ; Comité Français de l'IUCN 2017) avec parmi elles le Busard de Maillard (*Circus maillardii*), le dernier rapace endémique de l'île. De son nom créole Papangue, il a été décrit par Verreaux en 1863, et Maillard en 1963. Cette espèce est protégée depuis l'arrêté ministériel du 17 février 1989, et est classée « en danger » d'extinction selon les critères de l'IUCN. La tendance générale de la dynamique de population de busard reste difficile à déterminer, mais l'espèce est soupçonnée d'avoir subi une baisse lente entre 2000 et 2010 avec actuellement entre 200 et 560 individus matures estimés en fonction des études (SEOR, Com. Pers., Bretagnolle *et al.* 2000a,b ; Grondin & Philippe 2011 ; BirdLife International 2016).

4.2 *Parmi les causes suspectées de mortalité du busard : son exposition aux rodenticides*

A l'issu du Plan de Conservation du Busard de Maillard (Grondin et Philippe, 2011), trois menaces majeures ont été identifiées pour cette espèce : le braconnage, les collisions (lignes électriques, avions ou éoliennes) et l'empoisonnement secondaire aux rodenticides utilisés notamment pour contrôler les populations de rongeurs sur l'île. L'exposition aux rodenticides semble être la cause la plus importante d'accueil de busards au centre de soin de la Société d'Etude Ornithologique de la Réunion (SEOR), avec 29% des cas de mortalité susceptibles d'être causés par une exposition aux rodenticides (Grondin et Philippe, 2011). Cependant, aucune information précise ne semble disponible sur les modalités d'exposition de celui-ci.

4.3 *Les rongeurs, leurs implications agro-économique, environnementales et sanitaires à l'échelle de l'île.*

Dans de nombreuses îles du monde, les rongeurs du genre *Rattus* et *Mus*. sont considérés comme des espèces envahissantes responsables de divers dommages sur la santé humaine, les produits alimentaires et / ou les écosystèmes et la biodiversité, notamment parce qu'ils menacent les espèces endémiques (Singleton *et al.* 1999, Howald *et al.*, 2015). À la Réunion, les rats (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*) et la souris domestique (*Mus musculus domesticus*) occupent de nos jours un large éventail d'habitats. On les trouve dans les zones urbaines où ils peuvent impacter les denrées alimentaires ainsi que les installations ou dans les zones rurales où ils se nourrissent de cultures agricoles et en particulier des plantations d'arachides, de pois, mais surtout de canne à sucre, principale production agricole de l'île. Les rats, en consommant la base de la canne, vont causer de petites dégradations des entre-nœuds, entraînant ainsi la réduction des flux de nutriments et augmentant les risques d'infections fongiques secondaires, ce qui aura pour effet de réduire le rendement en saccharose (Mansuy et Fontaine. 2014). Les pertes sont ainsi estimées pour cette culture à 10-15% de la récolte annuelle (Grollier et Soufflet, 2011 ; Siegmund. 2011).

L'île de La Réunion est considérée comme faisant partie d'un « hotspot » de biodiversité (Myers *et al.* 2000). Du fait d'un gradient altitudinal culminant à 3071 mètres et de l'existence d'un gradient climatique entre l'Est et l'Ouest de l'île, elle présente une importante diversité d'habitats naturels et d'espèces endémiques, qui pour certaines sont menacées. L'île subit en effet une augmentation sévère et croissante des espèces invasives introduites (Macdonald *et al.* 1991). Actuellement, quarante-deux espèces de vertébrés introduites sont dénombrées. Les deux espèces de rats, la souris domestique ainsi que le chat domestique (*Felis silvestris catus*) sont connus pour avoir conduit à l'extinction de nombreuses espèces d'oiseaux dans des zones insulaires. A la Réunion, nous pouvons notamment citer la Huppe de Bourbon en 1850 (*Fregilupus varius*) et la Perruche verte des Mascareignes en 1732 (*Psittacula eques*) (Moncorps *et al.* 2010 ; Comité Français de l'IUCN 2017 ; Cheke 1987 ; Barré *et al.* 1996 ; Drake 2009). Les populations de Pétrel de Barau *Pterodroma baraui*, de Pétrel de Bourbon *Pseudobulwerria aterrima* ainsi que de Échenilleur de La Réunion *Coracina* ou *Lalage newtoni* sont actuellement des espèces en difficulté notamment du fait de la présence de chats mais également de rats sur leurs sites de reproduction qui consomment les œufs et les jeunes au nid (SEOR Com. Pers.).

Les rongeurs posent également problème en termes de santé publique. Ils interviennent dans la transmission à l'homme d'une soixantaine de zoonoses (Singleton *et al.* 2010 ; Buckle et Smith, 2015) dont notamment la leptospirose, pour laquelle les Rats noirs et bruns présentent une séroprévalence élevée. Chez ces deux espèces, cette prévalence a par exemple été mesurée dans une étude récente sur différents sites de l'île comme étant en moyenne 39 et 31%, respectivement (Guernier *et al.*, 2016). La prévalence chez l'Homme de cette maladie est chaque année environ 7 à 10 fois plus élevée sur l'île qu'en métropole. Chaque année, entre 40 et 80 cas humains sont détectés sur l'île. Pour les données les plus récentes publiées, au cours des l'années 2017, 57 personnes ont été contaminées par la leptospirose à la Réunion (Santé Publique France 2019). Les facteurs de risque identifiés sont principalement liés à l'activité professionnelle (activités agricoles, jardinage, élevage), les activités récréatives en eau douce ou rattachés à un habitat propice à la contamination (insalubrité, présence de déchets, rats...) (Institut Pasteur, 2018). Entre les années 1970 et 2000, 13 à 17% des cas d'hospitalisation survenus ont entraîné la mort du patient (Mailloux 1980 ; Pertuiset *et al.*, 1988). Depuis, 90% des cas confirmés ont été hospitalisés et plus d'un tiers des patients ont séjourné en réanimation (CIRe Océan Indien 2016; Pagès *et al.* 2014). La mortalité à la Réunion ces dernières années est globalement stable avec 4-5% des cas diagnostiqués/déclarés.

4.4 Le contrôle des populations de rongeurs sur l'île

4.4.1 Modalités de traitement

Que ce soit pour la sauvegarde d'espèces en danger critique d'extinction, pour des raisons sanitaires ou encore agro-économiques, le contrôle des populations de rongeurs apparaît indispensable sur l'île de la Réunion. A l'échelle mondiale, ce contrôle repose principalement sur une lutte chimique à base d'appâts rodenticides anticoagulant antivitamine K (AVKs).

Sur l'île, la FDGDON organise notamment deux campagnes de dératisation par an, principalement dans les plantations de canne à sucre. Parmi les différentes substances actives disponibles sur le marché, celles principalement utilisées par le monde agricole lors de ces campagnes semblent être celles de seconde génération avec notamment la bromadiolone puis ensuite le difenacoum et le brodifacoum (Siegmond. 2011 ; FDGDON Com. Pers. ; Entretiens avec des agriculteurs). La lutte est organisée autour du règlement (UE) n° 528/2012 du parlement européen et du conseil du 22 mai 2012 qui concerne la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides. Les produits « biocides »

contiennent ou génèrent des substances actives destinées à lutter contre les organismes qui sont nuisibles à la santé humaine ou animale ou qui détruisent des biens (qui ne sont pas des plantes).

Même si la réglementation impose de distribuer des appâts dans des stations d'appâtage sécurisées, lors des traitements dans les parcelles de canne à sucre, les appâts sont le plus souvent distribués directement au sol sous la forme de sachets hermétiques contenant des céréales concassées (ex. maïs) enrobées selon un dosage à 50 mg de substance active par kg. Ces substances interviennent en bloquant le cycle de recyclage de la vitamine K (Le Bonniec, 2004). En présence d'anticoagulants, les facteurs de coagulation ne peuvent plus être gamma-carboxylés ce qui rend leur activation impossible. La coagulation est perturbée voir stoppée. Les microlésions capillaires provoquent des hémorragies induisant la mort de l'animal entre 2 et 10 jours après l'ingestion d'une dose létale (Grolleau *et al.* 1989 ; USEPA 1998).

4.4.2 Implications écotoxicologiques

Le développement de résistance aux rodenticides anticoagulants de première génération chez les rongeurs (par exemple la warfarine, la chlorophacinone) a conduit au développement et à l'utilisation de rodenticides anticoagulants de deuxième génération, à savoir bromadiolone, difénacoum, brodifacoum, flocoumafen et diféthialone. S'ils sont plus efficaces, ils sont également plus persistants dans les tissus des espèces cibles (WHO 1995 ; Erickson et Urban 2002 ; Vandenbroucke *et al.*, 2008) et plus toxiques chez les espèces non cibles comme les oiseaux et autres mammifères (Erickson et Urban 2004). Ceci conduit à une exposition secondaire ou à des empoisonnements élevés chez les prédateurs des rongeurs (Coeurdassier *et al.* 2014; Rattner *et al.*, 2014; Shore *et al.*, 2015). Leur impact dommageable sur la faune non-cible a été rapporté dans le monde entier (e.g. Angleterre : Mc Donald *et al.* 1998 ; Shore *et al.* 1996 ; Shore *et al.* 2003, France : Fournier-Chambrillon *et al.* 2004 ; Lambert *et al.* 2007, USA : Stone *et al.* 1999, Nouvelle Zélande : Eason *et al.* 2002). Ces intoxications peuvent être de trois natures. Elles sont dites primaires lorsqu'elles interviennent à la suite de consommation directe d'appâts empoisonnés et secondaires par consommation de cadavres ou de proies vivantes intoxiquées. S'il ne peut être exclu que d'autres espèces non-cibles soient exposées en consommant directement les appâts, tel que présenté précédemment, le Busard de Maillard est probablement exposé en consommant des proies (rongeurs) qui ont-elles-mêmes consommées des appâts. L'estimation de l'exposition secondaire des prédateurs aux rodenticides doit de ce fait prendre en considération la quantité de résidus disponibles dans les tissus des rongeurs cibles et non-cible qui est elle-même liée à la quantité d'appâts disponibles et à la persistance des substances actives en nature. Les taux de résidus disponibles dans le corps des rongeurs sont en effet proportionnels en partie à la concentration en matière active des appâts et au temps d'exposition (Grolleau *et al.*, 1989 ; Merson *et al.*, 1984 ; Sage *et al.*, 2008). Afin de mieux comprendre les modalités d'exposition du busard de Maillard, il apparaît donc nécessaire de s'intéresser à ses trois échelles : appâts ; rongeurs ; prédateur.

4.4.3 Résistance des rongeurs aux substances actives

L'utilisation de pesticides provoque des réponses adaptatives, notamment par la sélection d'allèles de résistance dans les populations cibles. Des populations de rats résistants aux premières molécules mises sur le marché ont été observées dès 1958, soit moins de 10 ans après la mise sur le marché de la première molécule (Boyle 1960). Pour ces populations de rongeurs résistants, l'utilisation de molécules de première génération est devenue inefficace. Depuis, les industriels ont proposé de nouvelles molécules de plus en plus toxiques, mais

que ce soit en Europe, en Amérique, en Océanie... des cas de résistance à la plupart de ces nouveaux composés ont malheureusement également été observés dès les années 1980. Le mécanisme de résistance qui semble le plus répandu a été mis en relation avec plusieurs mutations du gène *vkorc1** codant pour la Vitamine K Epoxyde réductase (VKORC1*), enzyme cible des anticoagulants. Cette résistance de cible, différente d'une résistance métabolique, est due à l'apparition de SNPs* (Single Nucléotide Polymorphism) qui correspondent à un changement de nucléotide sur un des trois exons du gène *vkorc1*, engendrant un changement d'acide aminé sur la protéine (Grandemange *et al.* 2010). Les SNPs identifiés en Europe et les plus rencontrés chez le rat sont : Y139C, Y139F et L120Q, et chez la souris : Y139C et L128S (Pelz *et al.* 2011). Ces phénomènes de résistance majeurs se développent chez les rongeurs de par le monde. Dans la mesure où il n'existe pas d'alternative immédiate à l'usage de ces molécules, il est nécessaire de comprendre les résistances et d'apprendre à les gérer particulièrement en milieu insulaire avant d'être confronté à l'inefficacité du contrôle de ces populations. Parallèlement, l'emploi de molécules contre lesquelles les populations de rongeurs contrôlées sont résistantes entraîne une inefficacité et ainsi un allongement des campagnes de traitements ; augmentant ainsi le risque d'exposition secondaire de la faune non cible (Health and Safety Executive 2012). Shore *et al.* (2013) en apportent une première preuve *in situ*. Les chouettes effraies provenant des régions du Royaume-Uni où les rongeurs sont résistants aux rodenticides anticoagulants sont plus susceptibles d'avoir des résidus hépatiques de molécules de seconde génération détectables que les chouettes provenant des régions où la résistance n'a pas été détectée. Ainsi, la présence de résistance pourrait augmenter l'intensité des traitements et ainsi le transfert aux espèces non-cibles. Malgré ces interrogations, aucune information n'est à notre connaissance disponible concernant la présence ou non de souches résistantes sur l'île.

5 OBJECTIFS GENERAUX

Sur l'île de la Réunion, le phénomène d'exposition secondaire aux rodenticides concerne notamment le Busard de Maillard (*Circus maillardi*) ou Papangue, dont le régime alimentaire compte une forte proportion de rongeurs (50-70%) avec de faibles variations à l'échelle de l'île (Grondin et Philippe, 2011). Ce rapace semble en effet s'être adapté, voir spécialisé sur ce type de proies abondantes et facilement accessibles (Programme Feder en cours). Malgré une exposition aux rodenticides supposée très impactante pour la population de busard, à notre connaissance, très peu d'informations sont disponibles sur ses modalités d'exposition. Evaluer le transfert des rodenticides depuis les appâts, les rongeurs cibles jusqu'au busard paraît nécessaire. Dans cet objectif, quatre axes d'approche ont été définis.

5.1 Rongeurs - Axe 1 : Exposition des rongeurs après un traitement rodenticide en canne à sucre - écotoxicologie et résistance

Lors d'un traitement visant à contrôler les populations de rongeurs en canne à sucre, nous nous sommes intéressés pour cette première approche à répondre aux questions suivantes :

- Comment évolue la disponibilité d'appâts rodenticides et quelle est la persistance de la substance active en nature ?
- Quelle est l'exposition des rongeurs présents en canne à sucre ainsi que dans les habitats naturels (friche, forêt) autour d'une parcelle traitée ?
- Les populations de rongeurs rencontrées présentent-elles des mutations susceptibles de conférer une résistance aux rodenticides ?
- Quelles sont les implications en terme d'exposition du Busard de Maillard ?

5.2 Rongeurs - Axe 2 : Exposition aux rodenticides à une échelle spatiale large sur 6 sites différents, d'une des espèces de rongeur cible : le Rat noir

Sur la base d'échantillons hépatiques collectés sur des rats noirs capturés dans le cadre d'une étude réalisée par l'UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical) de l'Université de La Réunion, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Sans connaissance préalable de traitements rodenticides, quelle est l'exposition de rats noirs collectés sur 6 sites répartis sur l'île et présentant des habitats naturels différents.
- Cette exposition varie-t-elle en fonction de la saison (saison sèche ou saison humide) ou éventuellement d'autres paramètres individuels (ex. âge ou sexe du rongeur) ?

5.3 *Busard de Maillard - Axe 1 : Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard retrouvés morts en nature ou accueillis affaiblis puis morts en centre de soin (mesure des résidus hépatiques)*

Nous nous sommes ici intéressés à mesurer l'exposition aux rodenticides de Busards de Maillard retrouvés morts en nature ou accueillis vivants puis morts en centre de soin. Les mesures de résidus ont été effectuées dans le foie de ces animaux collectés par la SEOR entre 1999 et 2016. L'interprétation des résultats a été réalisée selon les approches suivantes :

- Les concentrations hépatiques mesurées ont été comparées aux données de toxicité rapportées pour les rapaces dans la littérature internationale.
- Les concentrations hépatiques mesurées ont été confrontées aux facteurs susceptibles d'influencer l'exposition des busards tels que l'âge ou le sexe des individus, la composition paysagère présente à proximité du site de découverte de l'animal ou encore la densité de couples dans cette zone ainsi que l'année de découverte de l'animal.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié en 2019 dans la revue *Biological conservation* (234, 37-44) intitulé « *Pesticides threaten an endemic raptor in an overseas French territory* ».

5.4 *Busard de Maillard - Axe 2 : Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard accueillis vivants en centre de soin ou prélevés en nature (mesure des résidus sanguins)*

Pour cette dernière approche, nous nous sommes intéressés à mesurer l'exposition aux rodenticides de Busards de Maillard vivants (mesure de résidus sanguins) selon deux protocoles d'échantillonnage :

- Individus accueillis vivants au centre de soin de la SEOR.

Il s'agit d'individus retrouvés déficients en nature et rapportés vivants au centre de soin et dont l'état de santé pouvait permettre la réalisation d'un prélèvement de sang.

- Individus capturés vivants en nature.

Il s'agit d'individus qui ont été capturés et manipulés dans un objectif de mise en œuvre d'une autre étude portant sur l'étude du régime alimentaire ou du suivi de déplacement et sur lesquels il a pu être réalisé également un prélèvement de sang (Autorisation CRBPO/MNHN, Programme de baguage personnel n°577).

Rongeurs - Axe 1 : Exposition des rongeurs cibles après un traitement rodenticide en canne à sucre – écotoxicologie et résistance

- Disponibilité des appâts et persistance de la substance active en nature,
- Exposition des rongeurs présents en canne à sucre ainsi que dans les habitats naturels proches des parcelles traitées (friche et forêt),
- Résistance des rongeurs cibles aux substances actives utilisées,
- Implication pour l'exposition secondaire du Busard de Maillard.

Synthèse des principaux éléments :

- Dans le cadre d'un traitement rodenticide en canne à sucre, les rongeurs semblent exposés très rapidement aux appâts, dans les 24 à 72 heures qui suivent leur distribution.
- Une partie des appâts reste disponible pendant au minimum 40 jours après leur distribution, les concentrations en substance active (ici la bromadiolone) sont alors encore très proches de celles mesurées dans les appâts le jour du traitement.
- L'exposition des rongeurs peut donc se prolonger pendant plusieurs semaines après un traitement (ex. en cas de recolonisation de parcelles traitées).
- Les résidus mesurés dans le foie des souris sont les plus importants 9,5 jours après le traitement.
- Les données sont insuffisantes sur rats pour modéliser cette cinétique.
- Une exposition à bas bruit a été montrée également sur des souris capturées en l'absence de traitements rodenticides connus récents.
- Le risque d'exposition de Busards de Maillard consommant des souris semble donc se prolonger pendant au minimum 40 jours après un traitement en canne à sucre, il est cependant maximum pendant les 15 à 20 jours qui suivent un traitement.
- Du fait d'un trop faible nombre de captures de Rat surmulot ou de Rat noir, il est difficile d'évaluer l'exposition du Busard de Maillard qui consommerait ces deux espèces.
- Sur les 30 souris qui ont pu être génotypées (9 lors de l'étude préliminaire et 21 lors de l'étude principale), 17 (57%) étaient porteuses de la mutation Y139C dont 13 (43%) homozygotes.
- Cette mutation est connue pour conférer une résistance forte à 5 des 8 rodenticides AVKs actuellement sur le marché, y compris aux molécules de seconde génération les plus anciennes (ex. bromadiolone et difénacoum).
- Les souris porteuses d'une mutation conférant une résistance montrent des concentrations hépatiques moyennes en AVKs deux fois plus élevées que celles dites sensibles. Le faible effectif (n=30) ne nous permet cependant pas de montrer une différence statistique.
- Tel qu'énoncé par plusieurs auteurs, nous pouvons tout de même supposer un risque plus élevé pour les prédateurs qui se nourriraient de rongeurs de souches résistantes.
- Les simulations d'exposition pour le Busard de Maillard conduisent à des doses prévisibles d'exposition selon les scénarios entre 78 et 523 fois inférieures aux doses létales aiguës pour 50% des animaux exposés (DL₅₀) définies pour le Colin de Virginie. Cette espèce est cependant relativement éloignée biologiquement du Busard de Maillard.
- Ces mêmes doses prévisibles d'exposition sont, selon les scénarios, de 2,6 à 17,3 fois supérieures à celles ayant entraîné la mort de Grands-ducs d'Amérique lors d'une exposition en laboratoire pendant 7 jours à des rats intoxiqués à la bromadiolone. Cette modalité d'exposition ainsi que l'espèce d'étude sont plus proches du contexte d'exposition du Busard de Maillard.
- **Ces derniers éléments soulignent un risque important de mortalité de Busards de Maillards se nourrissant de rongeurs sur des parcelles de canne à sucre traitées aux rodenticides AVKs.**

1 OBJECTIFS ET CONTEXTE DE L'ETUDE

1.1 Objectifs

Lors d'un traitement visant à contrôler les populations de rongeurs en canne à sucre, nous nous sommes intéressés pour cette première approche à répondre aux questions suivantes :

- Comment évolue la disponibilité d'appâts rodenticides et quelle est la persistance de la substance active en nature ?
- Quelle est l'exposition des rongeurs présents en canne à sucre ainsi que dans les habitats naturels (friche, forêt) autour d'une parcelle traitée ?
- Les populations de rongeurs rencontrées présentent-elles des mutations susceptibles de conférer une résistance aux rodenticides ?
- Quelles sont les implications en terme d'exposition du Busard de Maillard ?

1.2 Contexte

Cette étude a été réalisée au cours de l'année universitaire 2015-2016 par Anne Sophie Pingon dans le cadre de sa 2^{ème} année de master d'écologie appliquée « Ecosystèmes, contaminants, santé » à l'Université de Bourgogne Franche - Comté. Le stage s'est déroulé au sein de la Société d'Etude Ornithologique de la Réunion (SEOR) sous la responsabilité de son directeur : François Xavier Couzi et avec comme co-encadrants :

- Mickaël Sage, Faune INNOV' R&D, encadrant principal.
- Etienne Benoit et Virginie Lattard, USC 1233 Rongeurs sauvages – INRA VetAgro Sup Lyon, encadrants biologie moléculaire.
- Michael Coeurdassier, UMR CNRS Chrono Environnement - Université de Bourgogne Franche-Comté, tuteur universitaire.

L'ensemble des analyses toxicologique a été réalisé par :

- Isabelle Fourel, USC 1233 Rongeurs sauvages – INRA VetAgro Sup Lyon,

Ont également participé aux travaux :

- Steve Augiron, SEOR, assistance technique et scientifique.
- Pierrick Ferret, SEOR, assistance technique et scientifique terrain.

2 METHODOLOGIE

2.1 Expérimentation en nature

2.1.1 Calendrier

La première étude de terrain s'est déroulée du 4 au 24 Novembre 2015.

Elle avait pour objectif de déterminer les espèces de rongeurs rencontrées dans trois habitats susceptibles d'être des territoires de chasse du busard (friche, canne à sucre, et forêt). Afin d'adapter au mieux les protocoles et d'optimiser le calendrier de la seconde étude (étude principale), ce premier échantillonnage a permis d'obtenir un aperçu des molécules d'AVKs présentes chez les individus capturés ainsi que les types de mutations génétiques susceptibles d'être rencontrées sur l'île et qui pourraient conférer aux rongeurs une résistance aux AVKS.

La seconde étude de terrain (étude principale) s'est déroulée du 6 Février au 23 Mars 2016.

Elle avait pour objectif de caractériser l'exposition des rongeurs dans et autour d'une zone de canne à sucre traitée aux AVKs. Basée sur le protocole de distribution des appâts généralement retenu par les agriculteurs, cette seconde étude a été réalisée avant les premières campagnes de dératisation qui sont habituellement menée sur l'île de mi-mars à fin mai.

2.1.2 Site d'étude

La zone se situe sur le quart Nord-Est de l'île de la Réunion, sur la commune de Bras-Panon (centre du site d'étude : -21° 00' 38,9" S ; 55° 40' 20,9" E). Le site d'étude a été choisi pour quatre raisons principales :

- De nombreuses données d'observation du Busard de Maillard ont été relatées dans des études précédentes sur cette zone (Bretagnolle *et al.* 2000a,b ; Gonin 2001 ; Grondin & Philippe 2011 ; Valette 2013).
- La présence d'habitats susceptibles d'être des territoires de chasse du busard (friche, ravine, forêt secondarisée) à proximité immédiate des plantations de canne à sucre.
- Le site est soumis à une distribution de rodenticides depuis plusieurs années et permet de ce fait d'être représentatif du contexte écologique des zones habituellement traitées.
- Les échanges et collaborations avec les agriculteurs et la SEOR sont fructueux et facilitent le transfert d'informations entre les pratiques agricoles et la méthodologie retenue pour l'étude.

De manière à maîtriser au mieux les conditions de l'étude, il avait été demandé aux agriculteurs à l'automne 2015 de ne pas effectuer de traitement rodenticide sur l'ensemble du site jusqu'à l'été 2016.

Deux zones ont été définies (Figure 1) :

Une « zone de traitement contrôlé » de 6 ha constituée de parcelles de canne à sucre à différent stade de croissance (inférieur à 1,3 m ou compris entre 1,3 m et environ 2,5 m) sur lesquelles un traitement rodenticide a été réalisé par nos soins le 13 février 2016.

Une « zone périphérique » dénommée également « zone tampon » de 21 ha entourant la zone centrale de traitement contrôlé. Cette zone est recouverte d'habitats susceptibles d'être des territoires de chasse du busard (friches, forêt secondarisée mais également d'autres plantations de canne à sucre). Dans l'objectif de suivre l'éventuelle dispersion spatiale des rongeurs ayant ingéré des appâts au sein de la zone de traitement contrôlé, cette zone périphérique a été définie sur un périmètre de 200 m autour de la « zone de traitement contrôlé ». Très peu d'informations sont, à notre connaissance, disponibles sur la dispersion des rongeurs (rats ou souris) en milieu tropical ou en zone de plantation de canne à sucre. Nous nous sommes de ce fait basés sur des distances de dispersion étudiées dans le contexte écologique le plus proche à savoir en forêt californienne, des rats femelles ont montrés des déplacements de 6 à 97 mètres et les mâles des déplacements de 11 à 179 mètres de leur terrier (Whisson *et al.*, 2007).

Nous nous sommes aperçus mi février 2016 qu'un agriculteur n'avait pas pu être prévenu à l'automne 2015 du déroulement de nos travaux et avait ainsi traité sa parcelle mi-janvier avec des appâts à base de bromadiolone (Bromakal - Takamaka Industrie à 5 kg/ha). Cette parcelle située au nord de la zone de traitement contrôlé est incluse dans la zone tampon. Elle sera considérée lors de notre analyse comme une « zone de traitement non contrôlé ». Du fait de la découverte tardive de ce traitement quelques jours après la réalisation du nôtre, il n'a pas été possible de changer de site d'étude ou encore de modifier le protocole. L'organisation des 2 sessions de capture de rongeurs avant notre traitement nous permettra dans tous les cas d'identifier l'éventuelle contamination de la zone et d'en tenir compte lors de l'interprétation des données.

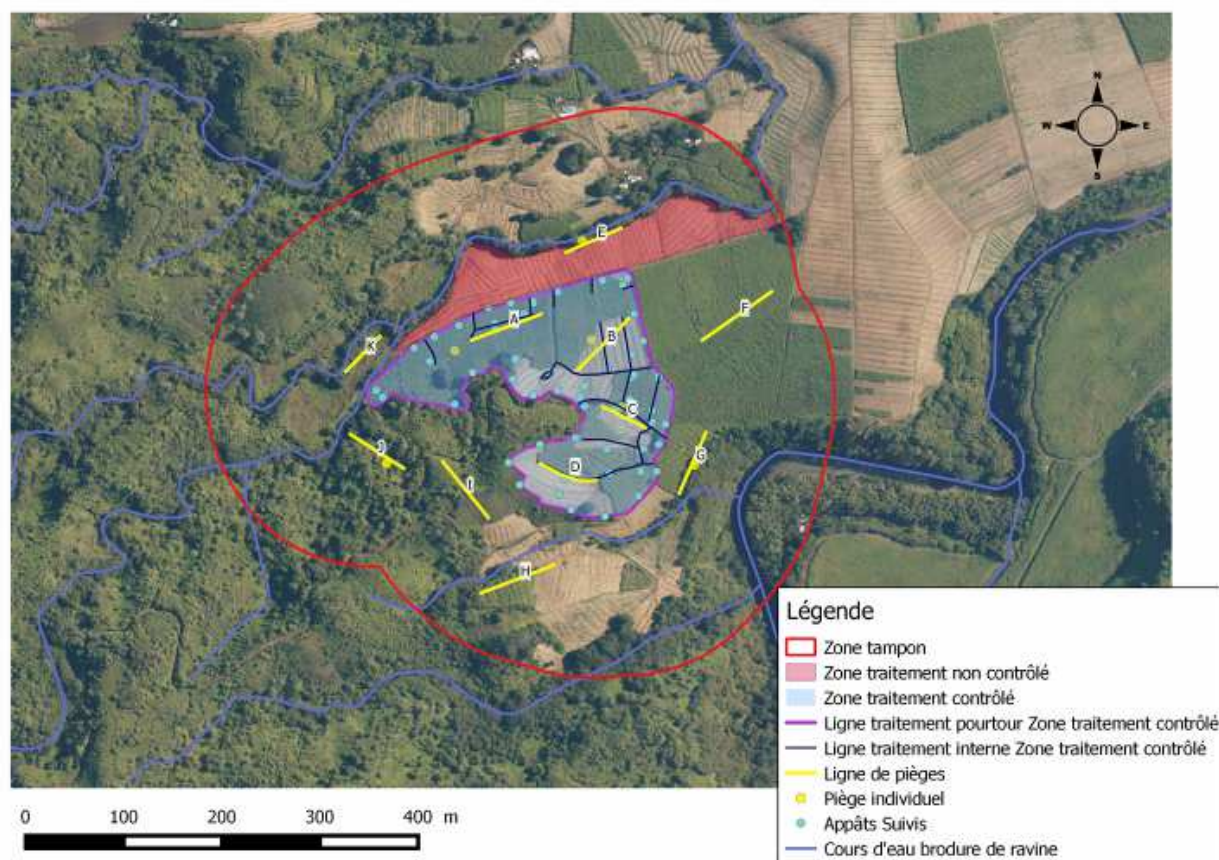


Figure 1. Cartographie de la zone d'étude.

2.1.3 Traitement rodenticide

Parmi les molécules retrouvées dans le foie des rongeurs capturés lors de l'étude préliminaire, la bromadiolone a été détectée le plus fréquemment (voir paragraphe résultats). Ceci confirme les informations collectées auprès des agriculteurs interrogés ainsi que celles fournies par la FDGDON. Pour notre étude, nous avons de ce fait porté notre choix sur l'utilisation d'appâts contenant cette substance active. Sur la base des recommandations formulées par la FDGDON auprès des agriculteurs et en concordance avec les informations que nous avons recueillies en rencontrant ceux-ci sur le site d'étude, le traitement a été réalisé sur la zone « traitement contrôlé » à raison de 3 kg d'appâts distribués par hectare avec des sachets d'appâts de 50 g de maïs concassé enrobé de Bromadiolone à 0,005% (Contrôl B – Hortibel). Ces appâts ont été achetés en coopérative agricole sur l'île. Le traitement a été réalisé de manière à reproduire celui effectué par les agriculteurs, c'est-à-dire en déposant les appâts directement au sol à quelques mètres des chemins le long des ravines et dans les friches. Dans la canne à sucre, ils ont soit été déposés dans les parcelles lorsque celles-ci étaient praticables à pied (hauteur des cannes inférieure à 1,3m), soit été déposés à quelques mètres des chemins autour des parcelles lorsque la canne était trop haute et peu accessible (hauteur des cannes supérieure à 1,3m).

Au total, 392 appâts de 50g (19,6 kg) ont été déposés sur l'ensemble de la « zone de traitement contrôlé » le 13 février (Figure 1). Le long des chemins bordant les parcelles de canne, friches et ravines, 227 appâts ont été déposés (« traitement interne » – traits bleus sur la Figure 1). Le contour de la « zone de traitement contrôlé » a reçu 165 appâts (« traitement pourtour » - traits violets sur la Figure 1). Les différents habitats rencontrés sur le site et intégrés à l'étude sont illustrés dans la Figure 2.



Figure 2. Représentation des trois habitats intégrés dans l'étude : plantation de canne à sucre, friche et forêt secondarisée.

2.1.4 Persistance des appâts et de la substance active en nature

Persistance des appâts en nature

Un suivi de la disparition de 55 appâts sur les 392 distribués (14%) a été réalisé pendant les 10 semaines qui ont suivi le traitement (« appâts suivis » sur la Figure 1) soit 13 appâts en canne à sucre, 22 en bordure canne-chemin, 17 en bordure canne-friche, et 3 en bordure friche-chemin. Cela correspond de manière régulière à 1 appât suivi sur 5 distribués ou 1 appât suivi sur 9 distribués en fonction des zones de distribution (depuis les chemins ou à l'intérieur des parcelles). Les coordonnées géographiques de chacun de ces appâts ont été relevées et chaque appât suivi a été matérialisé sur le terrain par un ruban de balisage à proximité.

Les indices de consommation de ces appâts ont été relevés dès le lendemain du traitement et cela deux fois par semaine pendant six semaines puis une fois par semaine pendant quatre semaines. Lors de chaque contrôle, les appâts ont été répertoriés selon trois catégories : Présent intact (appât ni déplacé ni consommé), Présent percé (appât non déplacé mais sachet plastique percé et appât partiellement consommé par un rongeur), et Disparu (déplacé ou entièrement consommé par un rongeur). Une estimation visuelle de la quantité de céréales consommée a également été réalisée et ces relevés ont été effectués en distinguant les différents habitats (centre de parcelles canne à sucre, bordure de chemin, friche et interface friche / canne à sucre). Non prévue initialement, cette étude a été réalisée sans surcoût pour le maître d'ouvrage. Le temps imparti pour l'étude ne nous a cependant pas permis d'analyser séparément les informations relatives à la consommation des appâts en fonction des habitats.

Persistence de bromadiolone dans les appâts

La persistance de la bromadiolone au cours du temps a été mesurée dans les appâts déposés en nature. Pour cela, en complément des appâts distribués pour le traitement, 5 autres appâts ont été déposés au sol sous une grille les protégeant d'une consommation par les rongeurs. Un appât a ensuite été prélevé à J4, J7, J11, J14 et J25 (ordre de prélèvement déterminé aléatoirement) puis conservé à -20°C jusqu'au dosage de la molécule mère. Les concentrations ont ensuite été comparées à celles mesurées dans un appât prélevé à J0, jour du traitement. Non prévue initialement, cette étude a été réalisée sans surcoût pour le maître d'ouvrage.

2.1.5 Capture et échantillonnage de rongeurs

Les espèces de micromammifères visées sont la souris domestique, le Rat noir ou le Rat surmulot. Aucune d'elles ne nécessite l'obtention d'une autorisation pour leur capture et leur manipulation.

Trois types de pièges ont été utilisés : Des tapettes à rats Lucifer® en bois, des tapettes à souris Lucifer® en bois et des pièges E2 Goodnature®. Deux types d'appâts ont été utilisés : des WaxTag (mélange fait maison de beurre de cacahuètes et de cire de bougie fondue) utilisés depuis plusieurs années sur l'île pour la capture ou le monitoring de rongeurs, ainsi que des Nara® Lure - eMitter (arôme de vanille encapsulé dans un bouchon en silicone), développés spécifiquement pour résister à la chaleur et à l'humidité.

Etude préliminaire (Novembre 2015)

Huit lignes de pièges (transects) ont été posées, dans trois types d'habitats différents : deux transects en parcelle de canne à sucre, trois en forêt et trois en friche. Chaque transect comportait entre douze et vingt-deux tapettes, chacune espacées l'une de l'autre de cinq mètres et positionnées en alternant tapette à rat et tapette à souris (au total, 124 tapettes ont été utilisées, 62 tapettes à rat et 62 tapettes à souris). Toutes ont été appâtées avec des Waxtag

Etude principale (Février-Mars 2016)

Onze transects de 20 pièges ont été disposés dans les trois types d'habitats soit 120 tapettes à rat et 120 tapettes à souris. Comme pour l'étude préliminaire, chaque piège était espacé de cinq mètres en alternant les types de tapette. Les transects ont été répartis de la manière suivante : 4 en « zone de traitement contrôlé » (nommés A, B, C et D), 6 en « zone tampon » (nommés E, F, G, H, I, J et K). Afin de réduire le nombre de variables possibles et

d'améliorer l'interprétation des résultats, les transects en zone tampon ont été placés parallèlement à la zone de traitement contrôlé et à égale distance de celle-ci (Figure 1; Tableau 1). Les pièges ont été appâtés alternativement avec des Nara Lure ou des Waxtag

En complément, six pièges Goodnature® ont été disposés sur l'ensemble de la zone d'étude, trois dans la « zone de traitement contrôlé » et trois dans la « zone tampon » (« Piège individuel » Figure 1). Ils ont été fixés sur un arbre, à 15 cm au-dessus du sol et appâtés avec des Nara Lure ou de l'arôme vanille déposé sur un coton.

Tableau 1. Répartition des transects de piégeage et des pièges individuels en fonction des habitats sur la zone de traitement contrôlé et la zone tampon.

Habitat	Zone	Transect	Piège individuel (nb.)
Canne	Traitement contrôlé	A, B, D	3
	Tampon	F	2 (bordure canne haie / ravine)
Friche	Traitement contrôlé	C	
	Tampon	E, H, G	
Forêt	Tampon	I, J, K	1

Calendrier de piégeage

Avant le traitement, deux piégeages ont été effectués dans la nuit du 6 au 7 février puis dans la nuit du 10 au 11 février afin de pouvoir mesurer, dans les individus capturés, le seuil de contamination éventuelle en rodenticide avant le lancement de l'étude.

Après le traitement, douze sessions de captures ont été programmées du 16 février au 23 mars (nuits de J2 à J3 puis de J3 à J4 ; nuits de J9 à J10 puis de J10 à J11 ; nuits de J16 à J17 puis de J17 à J18 ; nuits de J23 à J24 puis de J24 à J25 ; nuits de J37 à J38 puis de J38 à J39). Chaque session de capture correspond à 2 jours consécutifs. Les pièges ont été armés et appâtés l'après midi du 1^{er} jour puis relevés le 2^{ème} jour en début de matinée. Lorsque des appâts manquaient ou les pièges étaient désarmés, ils ont été à nouveau appâtés et armés l'après midi du 2^{ème} jour puis à nouveau relevés en début de matinée du 3^{ème} jour.

Chaque relevé de piège a été effectué en début de matinée afin de garantir une meilleure conservation des individus capturés, en vue de leur identification (consommation rapide par les fourmis) et de réduire le risque de dégradation des molécules dans les tissus par la chaleur après la mort de l'animal (dosage rodenticides).

2.2 Analyses en laboratoire

2.2.1 Prélèvements des différents tissus

Chaque animal a été identifié sur le terrain. Un cm de la queue (ou oreille ou doigts lorsque la queue n'était plus présente) a été prélevé et conservé dans de l'éthanol 70% en vue des analyses de génotypage résistance. Les carcasses de chaque individu ont ensuite été conservées à -20°C et à l'obscurité.

La dissection des animaux a été réalisée en 3 sessions : le 19 février, le 10 mars et le 24 mars. Lors de chacune de ces sessions, après une brève décongélation, les mesures morphométriques ont été réalisées (masse totale, longueur tête corps, longueur tête queue). Le sexe ainsi que le statut reproducteur (femelle allaitante ou gestante, mâle mature sexuellement) ont été relevés. Le foie de chaque individu a ensuite été prélevé dans un ordre reprenant celui de son jour de capture, dans le but de limiter les risques de contaminations aux AVKs entre des échantillons attendus comme présentant des écarts importants de concentration. Entre 0,50 et 0,55 g $\pm$ 0.01g de foie ont été prélevés pour dosage et conservés dans un tube falcon 50 ml à fond conique en polypropylène. Dans le cas d'un foie trop petit (masse < 0,50 g), l'ensemble du foie a été prélevé. Dans le cas d'un foie plus important (> 0,50 g), le reste du foie a été conservé dans un tube polypropylène à fond plat de 20ml. Chaque échantillon a ensuite été conservé à nouveau à -20°C jusqu'à son analyse.

En complément, les reins ont été prélevés en vue d'éventuelles études leptospiroses et ont été conservés dans un eppendorf 2 ml à -20°C. Les yeux ont été également prélevés et conservés dans du formole 10% en vue de déterminer l'âge relatif des animaux capturés. Ces échantillons restent disponibles pour de futures analyses.

Les outils de dissection ont été décontaminés et désinfectés entre chaque animal à l'aide d'une succession de différents bains : rinçage à l'eau chaude, puis bain MeOH/H₂O (50 : 50), puis rinçage avec MeOH/H₂O (50 : 50) et séchés à l'aide d'un papier absorbant propre. L'ordre de dissection des échantillons a été noté pour un meilleur suivi des résultats des dosages.

2.2.2 Dosage des Anticoagulants Anti Vitamine K

Dosage dans les foies

Les AVKs ont été dosés à partir de 0.5 g $\pm$ 0.01 g de foie (Fourel *et al.* 2010 ; Sage *et al.* 2010) broyé dans l'acétone à l'aide d'un ultra-turrax®. Le tout a ensuite été centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et le surnageant a été récupéré et évaporé sous un flux d'azote à 40°C. Les extraits lipidiques obtenus ont été mis dans un vial et introduits dans la chaîne analytique LC-MS/MS*, méthode qui combine la chromatographie en phase liquide puis la spectrométrie de masse. Cette méthode permet de doser simultanément huit AVKs et chaque échantillon a ensuite été comparé à des standards : le coumafène, le coumatétralyl, la chlorophacinone, la bromadiolone, le difénacoum, le flocoumafène, le brodifacoum et la diféthialone. Ces huit substances correspondent aux substances actives homologuées en Europe pour les produits rodenticides AVKs et sont ceux le plus couramment utilisés dans le monde. Une courbe de calibration a été réalisée et a permis la quantification de nos échantillons pour les différents AVKs. La LOQ (Limite Of Quantification) correspond au point le plus bas de la courbe de concentration, elle est ici comprise entre 1 et 2 ppb* ou 0,001 à 0,002 mg/kg. La LOD (Limite Of Detection) a été définie comme la moitié de la LOQ soit entre 0,0005 et 0,001 mg/kg.

Dosage des appâts rodenticides anticoagulants

Pour chaque échantillon collecté, 0,5 g d'appâts ont été broyés et analysés selon la procédure décrite précédemment et adaptée de Sage *et al.* (2007). Pour chaque broyat, trois extractions puis analyses ont été réalisées afin de s'affranchir de toute variation due à une homogénéité du broyat.

2.2.3 Génotypage résistance

Extraction ADN génomique*

Les analyses ADN ont été effectuées sur le prélèvement de queue, oreilles ou doigts. L'ADN génomique AGNg*a été extrait et purifié à l'aide du kit QIAGEN®. Pour cela, un morceau de chaque queue a été coupé en évitant tout risque de contamination croisée (nettoyage des outils de manipulation avec de l'éthanol 70° et identification des différents tubes). La lyse des tissus a été réalisée par incubation à 56°C durant toute une nuit dans une solution contenant un tampon de lyse fourni par le kit et de la protéinase K (hydrolyse des protéines avec une préférence pour les liaisons peptidiques situées après les acides aminés hydrophobes, tel que la leucine). Les acides nucléiques ont été retenus spécifiquement sur une colonne de silice (qui a une grande affinité avec l'ADN) et élués en suivant les recommandations du kit. Enfin, les ADN génomique extraits ont été conservés à +4°C.

Analyse des mutations

L'analyse des mutations a été réalisée par amplification par PCR* du gène *vkorc1* et séquençage des amplicons par la société Biofidal. La PCR a débuté par une étape de 3 minutes à 94°C, et 40 cycles ont permis d'amplifier l'ADN. Chaque cycle comportait trois étapes : une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 secondes, une étape d'hybridation à 63°C pendant 20 secondes et une étape d'élongation à 68°C pendant 70 secondes. Enfin une dernière étape d'extension a eu lieu à 68°C pendant 10 minutes. Chez le rat, l'exon 1 s'étend de 0 à 173 pb*, l'exon 2 de 1110 à 1219 pb et l'exon 3 de 2064 à 2266 pb. Chez la souris, l'exon 1 s'étend de 0 à 173 pb, l'exon 2 de 968 à 1077 pb et l'exon 3 de 2091 à 2293 pb.

Les produits PCR ont été séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5%, contenant un tampon de migration TBE (Tris Borate EDTA), du SafeView® (marqueur d'acide nucléique) et du Loading Dye® (qui alourdit l'ADN) à 100 mV, puis ont été visualisés sous UV.

2.3 Analyses des données

Les résultats de séquençage du génome ont été lus à l'aide du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor® et analysés avec le logiciel CLC Sequence Viewer 7®.Ink.

L'ensemble des données a été analysé à l'aide du logiciel Excel (Macro Office 2010) et du logiciel de statistique R (3.2.2). Les cartographies ont été réalisées à l'aide du logiciel GGis 2.8.6.

La normalité des résidus a été testée par le teste de Kolmogorov-Smirnov. Lorsque la normalité était acceptée ou lorsque les données ont pu être transformées, une ANOVA a été utilisée (Sokal et Rohlf, 1997). Dans le cas contraire, nous avons utilisés les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ou Wilcoxon Mann et Whitney pour comparer des échantillons indépendants. Lorsque cela a été possible, les moyennes et médianes ont été estimées par bootstrapping (réplicats = 1000).

La cinétique d'exposition des rongeurs a été modélisée à l'aide d'un modèle non linéaire de premier ordre dérivé de celui utilisé par Widianarko et Van Straalen (1996).

$$C(t) = \frac{(k_1 * a)}{(k_2 * k_1)} * (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

Où $C(t)$ est la concentration mesurée dans le foie à un temps t (mg/kg), a est le taux d'assimilation, k_1 est le taux constant d'assimilation de la substance active à l'échelle de la population, k_2 est le taux constant d'élimination intégrant tout autre processus de perte de concentration tel que par exemple la métabolisation.

3 RESULTATS

3.1 Persistance des appâts en nature

Sur les 55 appâts suivis, le lendemain du traitement, 90% étaient présents et intacts et 10% étaient toujours présents mais le sachet contenant les appâts était percé avec des indices laissant supposer qu'il l'avait été par un rongeur. Ces proportions se sont inversées 6 jours après le traitement. La proportion d'appâts présents percés est alors devenue plus importante (52%) que la proportion de présents intacts (45%). A cette date, le premier appât entièrement disparu a été noté. Si après 20 jours, seuls 16% des appâts sont encore intacts, 58% témoignent de traces de consommation de rongeurs mais restent disponibles sur le terrain. Vingt six jours après le traitement, cette tendance s'inverse et la proportion d'appâts disparus est devenue majoritaire, mais il est à noter que 39 jours après le traitement, 7% des appâts sont encore intacts et 11% restent présents mais partiellement consommés. L'ensemble des résultats est présenté graphiquement en Figure 3.

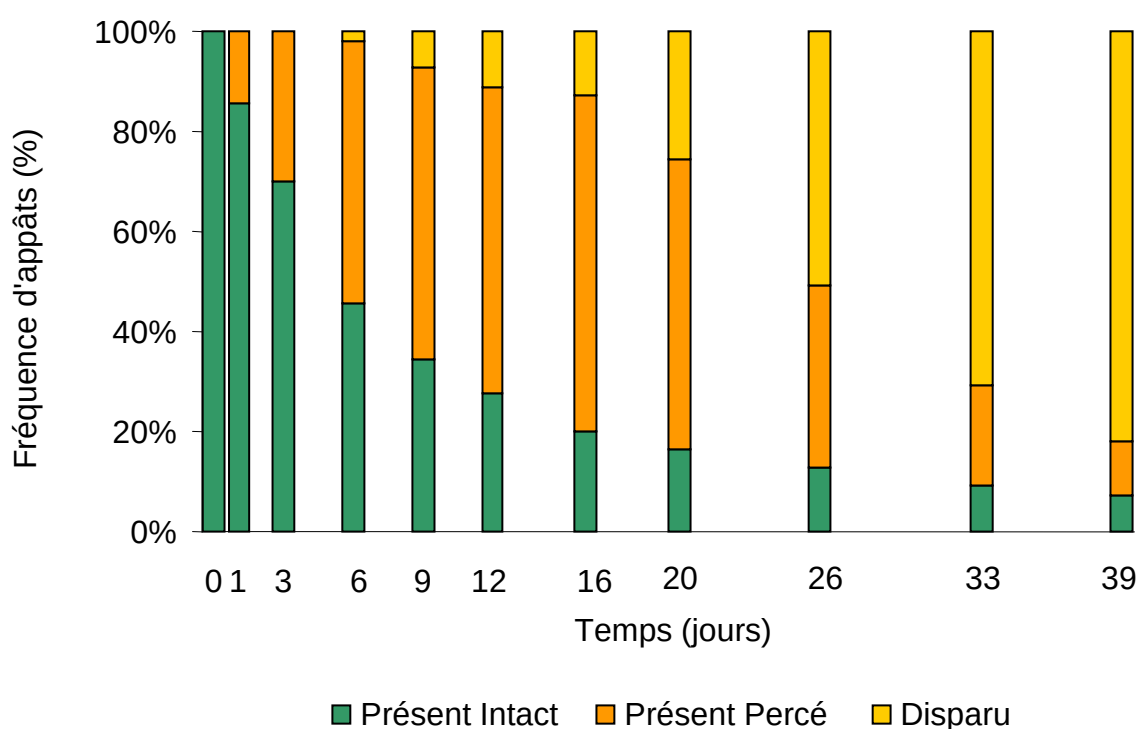


Figure 3. Persistance des appâts en nature (J0 : date de traitement). Appâts présents intacts en vert, présent percés en orange, disparus en jaune.

3.2 *Persistence de la substance active dans les appâts*

L'appât utilisé est commercialisé sous une formulation de maïs concassés enrobés de bromadiolone à une concentration de 50 mg/kg d'appât (Control B Hortibel). D'autres céréales ont cependant été observées dans les appâts (grains de blé et avoine entier et concassé). La concentration moyenne de l'appât en bromadiolone a été mesurée à $41,6 \pm 5,6$ mg/kg. En complément du difénacoum ($0,8 \pm 0,2$ mg/kg) et du brodifacoum ($> \text{LOD}$ mais $< \text{LOQ}$) ont également été détectés.

Pour les appâts distribués sous grille et collectés à différents pas de temps, nous observons graphiquement une légère diminution des concentrations dans les 10 premiers jours pour atteindre $34,4 \pm 1,1$ mg/kg 11 jours après la distribution des appâts. Il semblerait ensuite que les concentrations augmentent à nouveau pour les appâts collectés à J25 ($38,5 \pm 3,1$ mg/kg) (Figure 4). Nous attirons cependant l'attention sur des concentrations mesurées à différent pas de temps qui restent très proches les unes des autres et la nécessité de considérer la variabilité entre 3 mesures réalisées pour un même échantillon. Une analyse plus approfondie statistiquement serait pertinente mais n'a pas été possible durant le temps imparti à l'étude.

En complément de ces dosages réalisés sur des appâts spécifiquement distribués sous grille, deux analyses complémentaires ont été réalisées sur des appâts distribués lors du traitement et retrouvés intacts à J32 et J39. Les concentrations en bromadiolone mesurées dans ces appâts sont respectivement de $15,1 \pm 2,1$ et $40,9 \pm 6,2$ mg/kg. Du fait d'une différence de protocole de distribution entre ces appâts et ceux spécifiquement distribués pour le suivi de persistance (par ex. possible variations d'expositions au rayons du soleil pour des appâts distribués à différents endroits), ces deux résultats ont été volontairement exclus du graphique mais permettent tout de même d'apporter un complément d'information.

Les conditions climatiques au cours de l'étude ont été en moyenne de $24,8^{\circ}\text{C}$ (min : $17,4$; max : $32,3$) pour des quantités de précipitation comprises entre 578 et 744 mm par mois (www.meteo-nibiru.fr – Saint Benoît).

Afin de mieux caractériser la persistance de la substance active dans les appâts distribués en nature et notamment d'établir une $\frac{1}{2}$ vie de la molécule, les données demanderaient à être exprimées par un modèle de cinétique biphasique de premier ordre, mais le temps imparti à l'étude ne nous a pas permis de le faire.

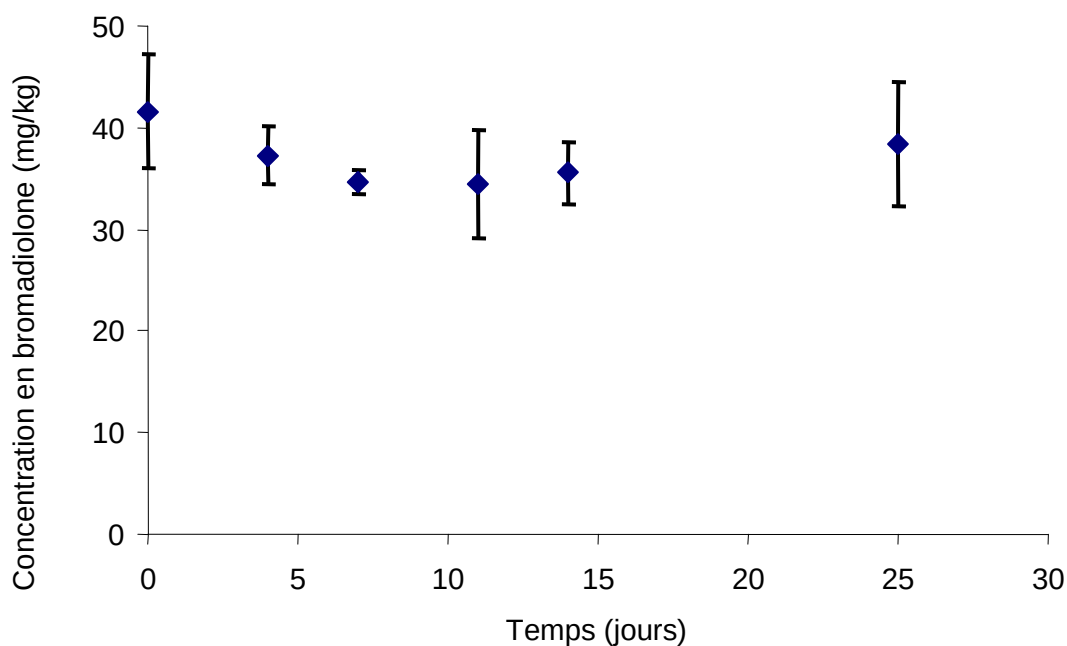


Figure 4. Persistance de la Bromadiolone dans les appâts en fonction du temps (mg/kg)

3.3 Espèces capturées

3.3.1 Etude préliminaire (novembre 2015)

Lors de l'étude préliminaire (novembre 2015), 124 tapettes ont été tendues pendant 62 sessions de 12 heures soit l'équivalent de 7688 nuits-pièges. Au total 14 rongeurs ont été capturés soit un succès de capture de 0,36%. Aucune autre espèce n'a été capturée. La répartition des différentes captures en fonction du type d'habitat échantillonné est présentée en Tableau 2.

Tableau 2. Espèce et nombre d'individus capturés dans chacun des habitats lors de l'étude préliminaire de novembre 2015.

Habitats	Etude préliminaire (novembre 2015)			
	Espèces			
	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus rattus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Bufo guttularis</i>
Forêt	3	4	0	0
Friche	3	2	1	0
Canne à sucre	1	0	0	0
TOTAL	7	6	1	0

3.3.2 Etude principale (février – mars 2016)

Lors de l'étude principale (février - mars 2016), 220 tapettes et 6 pièges individuels E2 Goodnature® ont été tendus pendant 14 nuits soit 3164 nuits-pièges au total. En tout, 28 rongeurs ont été capturés soit un succès de capture de 0,88%. Dans un même temps, 8 crapauds de l'espèce *Bufo guttularis* ont été capturés sans que notre protocole soit spécifique à cette espèce. La répartition des différentes captures en fonction des espèces et des habitats est présentée en Tableau 3 pour les captures effectuées avant et après traitement. La proportion des captures après traitement est représentée graphiquement dans la Figure 5.

Tableau 3. Espèce et nombre d'individus capturés dans chacun des habitats lors de l'étude principale de février – mars 2016 avant et après traitement rodenticide.

Habitat (Transect correspondant)	Etude principale (février - mars 2016)			
	Espèces			
	<i>Souris domestique</i>	<i>Rat noir</i>	<i>Rat brun</i>	<i>Crapaud Bufo guttularis</i>
Avant traitement				
Zone traitement contrôlé				
Friche (C)	0	0	0	0
Canne (A,B,D)	0	1	0	1
Zone périphérique				
Forêt (K,J,I)	0	1	0	1
Friche (E,G,H)	0	0	0	0
Canne (F)	1	0	0	0
TOTAL	1	2	0	2
Après traitement				
Zone traitement contrôlé				
Friche (C)	2	0	0	3
Canne (A,B,D)	9	0	0	3
Zone périphérique				
Forêt (K,J,I)	1	2	0	1
Friche (E,G,H)	8	0	0	2
Canne (F)	3	0	0	0
TOTAL	23	2	0	9

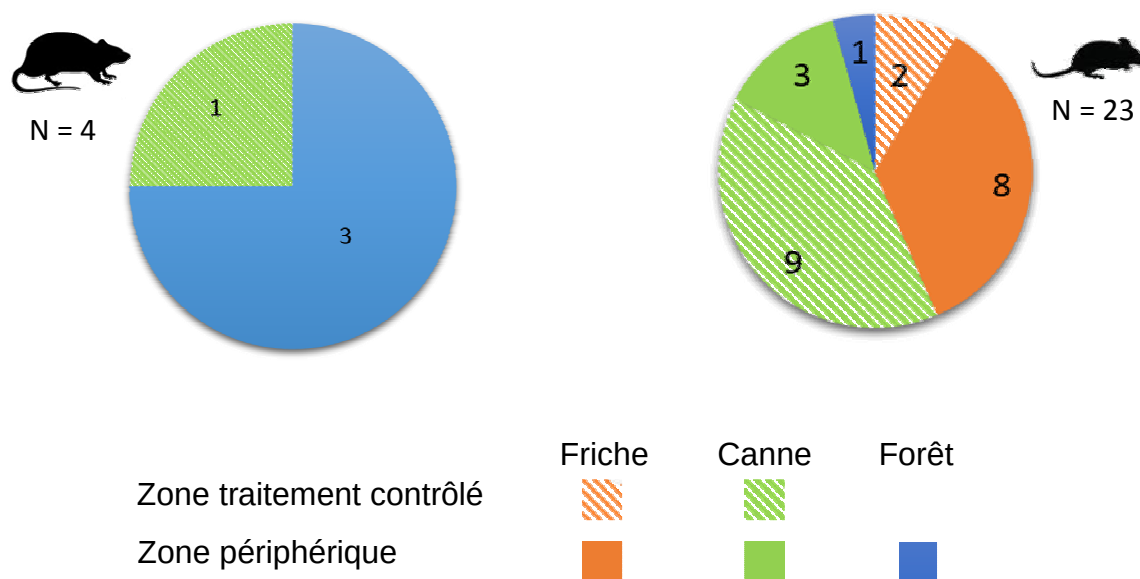


Figure 5. Répartition des captures de rongeurs réalisées après traitement en fonction des habitats.

Sur les transects B (canne - zone traitée), E (lisière canne / haie zone périphérique) et G (lisière canne / haie / ravine - zone périphérique), aucune capture de rongeurs n'a été réalisée. Ce sont sur les transects A (canne) et H (friche) que le plus grand nombre de capture de rongeurs a été réalisé (n=6 et 8, respectivement).

Seul un cadavre de rat a été retrouvé après traitement. Il a été collecté sur la « zone de traitement contrôlé » hors session de capture mais son état de décomposition ne nous a pas permis de définir les causes éventuelles de sa mort (empoisonnement ou capture par un prédateur) et aucune analyse ni génétique ni toxicologique n'a pu être réalisée.

Quarante et un pourcents des captures ont été réalisées sur les tapettes contenant des appâts Waxtag (n = 16 individus capturés, 12 souris, 4 rats) et 59% lorsque l'appât était un NaraLure® (n = 11 souris). Nous n'avons pas pu observer de différence significative d'attractivité entre les deux types d'appâts utilisés (Khi2, p-value > 0,05).

Nous pouvons cependant remarquer que tous les rats ont été capturés avec des appâts Waxtag.

3.4 Exposition des rongeurs aux rodenticides

3.4.1 Etude préliminaire (novembre 2015)

Sur les 16 individus capturés lors de l'étude préliminaire, 31% (n=5) présentaient des résidus d'AVKs dans leur foie (4 capturés en forêt et 1 en canne). Sur ces 5 individus, 4 molécules ont été détectées : la bromadiolone, le difénacoum, le brodifacoum et le coumafène. Parmi eux, 2 rongeurs ont été multi-exposés à deux AVKs : l'un à la bromadiolone et au brodifacoum, l'autre au difénacoum et au brodifacoum. Seule une souris capturée en canne à sucre était faiblement exposée au difénacoum (0,016 mg/kg). Sur les six rongeurs capturés dans la friche, aucun AVK n'a été retrouvé. Parmi toutes les souris capturées, une seule présentait une concentration en bromadiolone relativement élevée (1,704 mg/kg). Ces résultats sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Synthèse des informations pour les rongeurs capturés lors de l'étude préliminaire (novembre 2015). Concentrations en AVKs exprimées en mg/kg. Parmi les 8 molécules analysées, seules celles détectées dans au moins un échantillon sont présentées.

/ : Résidus d'AVKs inférieurs à la LOD.

Espèce	Warfarine	Bromadiolone	Difénacoum	Brodifacoum	Habitat	Résistant ou Sensible	Position mutation et Zygote
Rat noir	0,011	/	/	/	Forêt	Sensible	/
	/	/	/	/	Forêt	Sensible	/
	/	/	/	/	Forêt	Sensible	/
	/	/	/	/	Forêt	Sensible	/
	/	/	/	/	Friche	Sensible	/
	/	/	/	/	Friche	Sensible	/
Rat brun	/	/	/	/	Friche	Sensible	/
Souris domestique	/	/	/	/	Friche	Résistant	Y139C Homozygote
	/	/	/	/	Friche	Sensible	/
	/	/	/	/	Friche	Résistant	Y139C Hétérozygote
	/	/	/	/	Friche	Sensible	/
	/	/	0,016	/	Canne	Sensible	/
	/	/	/	0,004	Forêt	Résistant	Y139C Homozygote
	/	1,704	/	0,027	Forêt	Sensible	/
	/	/	0,005	0,040	Forêt	Résistant	Y139C Homozygote
	/	/	/	/	Forêt	Sensible	/

3.4.2 Etude principale (février – mars 2016)

Sur les 3 rongeurs (2 rats noirs et 1 souris domestique) capturés avant la mise en place du traitement rodenticide, aucun résidu d'AVKs n'a été détecté dans leur foie. Après le traitement à la bromadiolone, 18 des 21 souris domestiques capturées (85,7%) contenaient des résidus de cette molécule dans le foie (concentrations en mg/kg : min = 0,00 ; max = 31,60 ; moy = 3,83 ; med = 0,02 ; SD = 7,61). En parallèle, parmi ces 18 souris, 9 étaient

positives au difenacoum et/ou au brodifacoum soit 42,9% des souris capturées (concentrations en mg/kg : min = 0,000 ; max = 0,146 ; moy = 0,018 ; med = 0,002 ; SD = 0,041 pour le difenacoum et min = 0,000 ; max = 0,041 ; moy = 0,006 ; med = 0,002 ; SD = 0,012 pour le brodifacoum). Toujours parmi ces 18 souris, 10 présentaient des concentrations en AVKs supérieures à la concentration citée dans la littérature pour entraîner des effets létaux (0,4 mg/kg), une présentait une concentration forte susceptible d'entraîner des effets létaux ou sublétaux comprise entre 0,02 et 0,4 mg/kg, et 7 présentaient des concentrations plus faibles (inférieures à 0,02 mg/kg). Nous attirons cependant l'attention sur le fait que le seuil proposé dans la littérature à 0,4 mg/kg comme susceptible d'induire des effets létaux chez les rongeurs reste à discuter en fonction de la sensibilité de l'espèce à la substance active ainsi que de la cinétique d'exposition. Un rongeur qui présenterait après une exposition une concentration maximum hépatique de 0,4 mg/kg serait susceptible de ne pas montrer de signes cliniques alors qu'un rongeur pour laquelle la concentration hépatique aurait été plus forte dans les jours précédents le dosage pourrait, lui, montrer des signes cliniques (VetAgro Sup, Com. Pers.).

Toujours après le traitement, 1 Rat noir sur les 2 de capturés contenait des résidus de bromadiolone (0,005 mg/kg). Aucun résidu de coumatétralyl, de warfarine, de chlorophacinone, de flocoumafen ou de diféthialone n'a été détecté dans aucun des rongeurs capturés et aucun rongeur négatif à la bromadiolone ne contenait de résidus d'autres AVKs.

3.5 Cinétique d'exposition des rongeurs après traitement

Seuls 2 rats noirs ont été capturés après traitement, l'un 10 jours après distribution des appâts et ne contenant aucun résidu d'AVK détectable, l'autre 38 jours après et montrant une concentration de 0,005 mg/kg. Du fait du faible nombre de rats capturés après traitement, nous n'intégrerons pas cette espèce dans l'étude de cinétique d'exposition.

Dès la première session de capture 3 et 4 jours après le traitement, les 2 souris capturées contenaient des résidus de bromadiolone dans leur foie (0,73 et 1,28 mg/kg). Les concentrations les plus élevées ont été observées 11 jours après le traitement (31,6 mg/kg). Ces résultats sont présentés sur la Figure 6 pour les souris capturées au sein de la zone de traitement contrôlé et celles capturées en zone tampon.

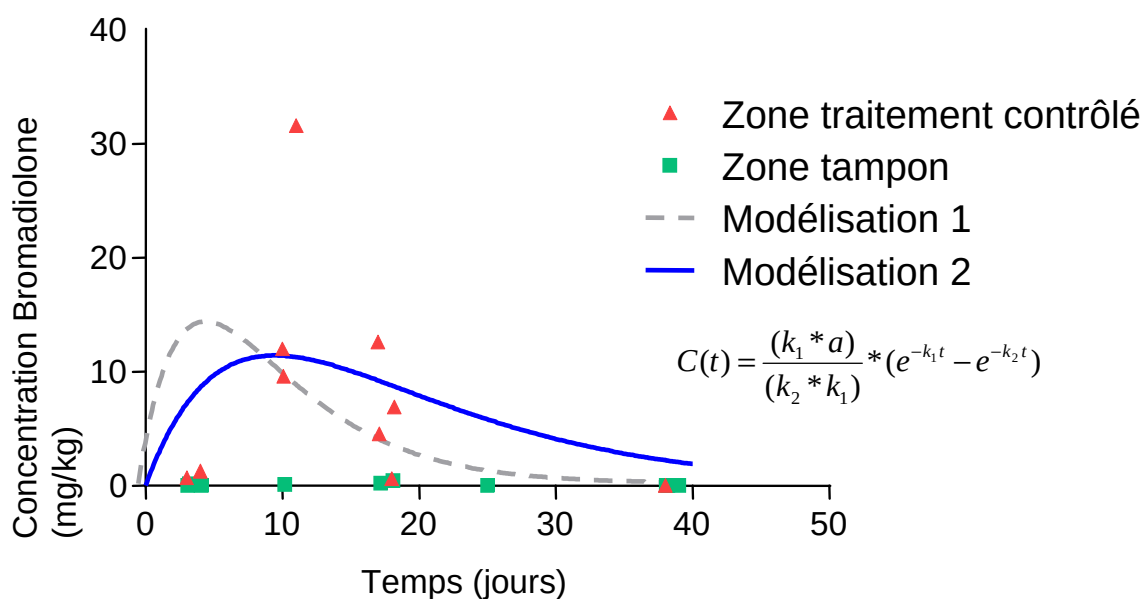


Figure 6. Concentration en bromadiolone (mg/kg) dans les foies de souris domestiques capturées en zone tampon et en zone de traitement contrôlé en fonction du nombre de jours après traitement. Modélisation sur les données zone traitement contrôlé.

La modélisation non linéaire n°1 effectuée avec le logiciel R ne semble pas graphiquement représenter au mieux les données mesurées. Les paramètres estimés lors de cette même modélisation ne sont pas significativement différents de la valeur zéro. Confirmant les observations graphiques, cela ne nous permet pas de valider ce modèle. La modélisation n°2 sous Excel semble graphiquement mieux correspondre, mais il nous est impossible de connaître la significativité des paramètres estimés par ce logiciel. La différence de paramètres estimés en fonction des deux modélisations (Tableau 5) semble provenir très probablement d'une différence d'algorithme entre les deux logiciels. Le temps imparti à l'étude ne nous a pas permis de résoudre ce problème analytique.

Sur la base de la modélisation 2, les concentrations augmentent progressivement dès les premiers jours après traitement et atteignent un maximum dans le foie des souris prévisible 9,5 jours après le traitement pour une valeur de 11,4 mg/kg. Les concentrations diminuent ensuite progressivement avec le temps.

Tableau 5. Paramètres de modélisation estimés pour exprimer la persistance hépatique de la bromadiolone dans la population de souris capturées dans la zone de traitement contrôlé avec le logiciel R (Modélisation 1) ou le logiciel Excel (Modélisation 2). ND : non déterminé

	Modélisation 1 (R)		Modélisation 2 (Excel)	
	Paramètre	p-value	Paramètre	p-value
a	31,083	>0,05	31,000	ND
k_1	0,225	0,3726	0,1052	ND
K_2	0,183	0,0795	0,1054	ND

3.6 Dispersion spatiale des rongeurs après traitement

Les concentrations mesurées en bromadiolone sont significativement plus faibles dans le foie des souris capturées dans la zone périphérique que celles mesurées pour les souris capturées dans la zone de traitement contrôlé (bootstrap BCa limit comparison, $p < 0,05$ et Wilcoxon Mann et Whitney $p = 0,0002$). Parmi les 11 souris capturées en zone tampon, 3 ne comportent pas de résidu de bromadiolone détectables dans le foie (concentration en mg/kg : min = 0 ; max = 0,44 ; med = 0,003 ; moy = 0,044 ; SD = 0,132). Parmi les 10 souris capturées en zone de traitement contrôlé, toutes contiennent des résidus quantifiables (concentration en mg/kg : min = 0,003 max = 31,6 ; med = 5,7 ; moy = 8,0 ; SD = 9,6). D'après le graphique en Figure 7, il semblerait que le maximum des concentrations soit observé légèrement plus tard dans la zone tampon (environ 17 – 18 jours après traitement) que dans la zone de traitement contrôlé. Afin de poursuivre cette analyse, il pourrait être à l'avenir opportun d'appliquer un modèle similaire à celui de Widianarko et Van Straalen (1996) pour chacune de ces modalités.

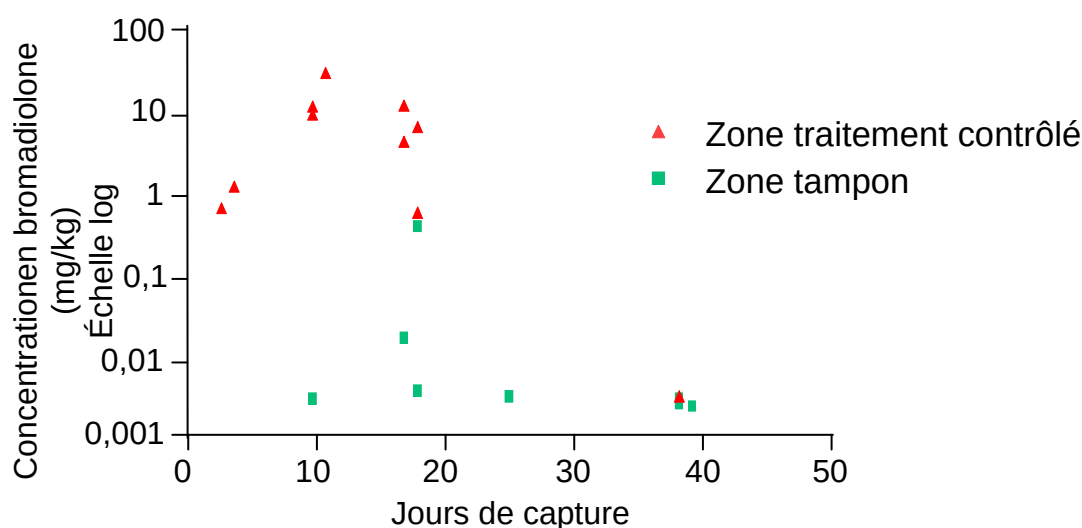


Figure 7. Concentration en bromadiolone (mg/kg) dans les foies de souris domestiques capturées en zone tampon et en zone de traitement contrôlé en fonction du nombre de jours après traitement (concentration en échelle logarithmique).

3.7 Résistance aux rodenticides

3.7.1 Etude préliminaire (novembre 2015)

Sur les 7 rats capturés au cours de l'étude préliminaire, aucun n'était porteur d'une mutation connue pour conférer une résistance aux AVKs. Sur les 9 souris capturées au cours de cette même période, 4 étaient porteuses d'une telle mutation (Y139C) dont 3 Homozygotes. Sur les 4 souris qui comportaient des résidus d'AVKs dans leur foie, 2 étaient sensibles et 2 résistantes. La concentration la plus élevée a été observée pour une souris sensible (Tableau 4). Les effectifs sont faibles (n=4) mais nous laissent supposer pour cette étude préliminaire, une absence de relation entre concentration observée en AVKs dans le foie et résistance.

3.7.2 Etude principale (février - mars 2016)

Sur les 4 rats capturés au cours de l'étude préliminaire (2 avant traitement et 2 après traitement), aucun n'était porteur d'une mutation connue pour conférer une résistance aux AVKs. Sur les 24 souris capturées au cours de cette même période (1 avant traitement et 23 après traitement), seul le génome de 21 souris a pu être séquencé (1 avant traitement et 20 après traitement). La souris capturée avant traitement dont le génome a pu être séquencé était porteuse de la mutation Y139C homozygote tout comme 9 souris capturées après traitement soit 45% des souris capturées après traitement qui ont pu être séquencées. Les 3 autres souris résistantes capturées après traitement étaient hétérozygotes pour cette même mutation soit 15% des souris capturées après traitement qui ont pu être séquencées. Au total, sur 21 souris séquencées, 13 étaient porteuses d'une mutation (62%) dont 10 homozygotes (48%). L'ensemble de ces informations est présenté dans le Tableau 6 et la Figure 8.

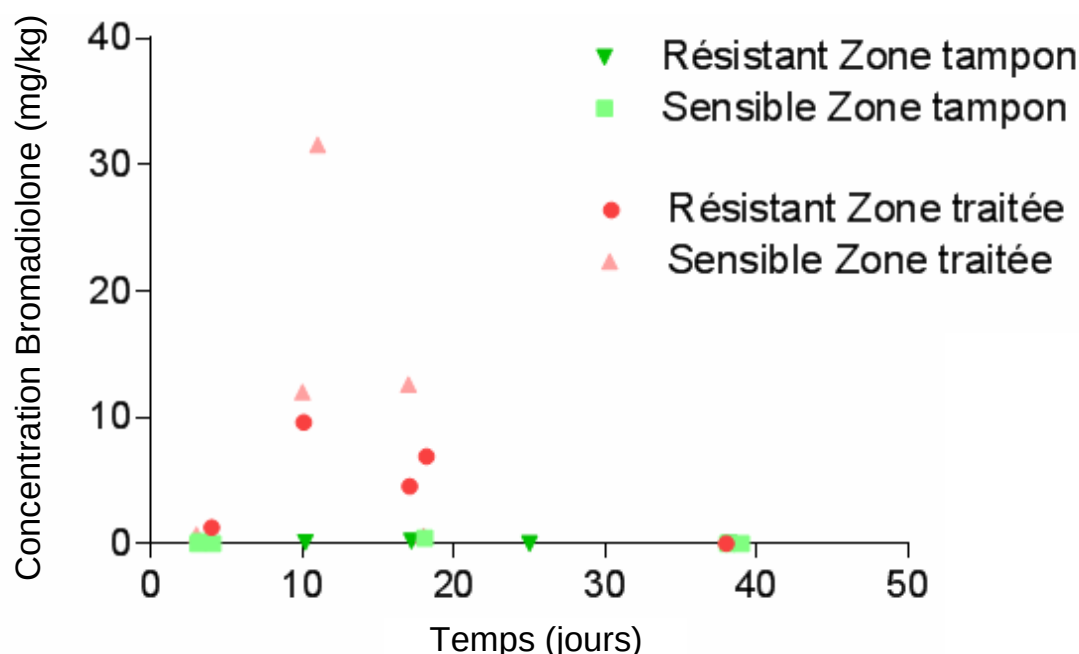


Figure 8. Concentration en bromadiolone (mg/kg) dans les foies de souris domestiques capturées en zone tampon et en zone de traitement contrôlé en fonction du nombre de jours après traitement. Les concentrations mesurées dans les souris porteuses d'une mutation connue pour conférer une résistance (résistantes) et celles qui ne présentent pas une telle mutation (sensibles) sont représentées différemment.

Tableau 6. Synthèse des informations pour les rongeurs capturés lors de l'étude principale (février-mars 2016). Concentrations en AVKs exprimées en mg/kg. Parmi les 8 molécules analysées, seules celles détectées dans au moins un échantillon sont présentées.

/ : Résidus d'AVKs inférieurs à la LOD. J0 : Jour du traitement. ND : Non Déterminé

Espèce	Jour de capture	Zone	Transect	Bromadiolone	Difenacoum	Brodifacoum	AVK Totaux	Résistant ou Sensible	Position mutation et Zygote	
Rat noir	-7	Traitement contrôlé	D	/	/	/	/	Sensible	/	
	-7	Tampon	I	/	/	/	/	Sensible	/	
	10	Tampon	J	/	/	/	/	Sensible	/	
	38	Tampon	K	0,005	/	/	0,005	Sensible	/	
Souris domestique	-3	Tampon	F	/	/	/	/	Résistant	Y139C	Homozygote
	3	Tampon	F	/	/	/	/	Résistant	Y139C	Homozygote
	3	Traitement contrôlé	D	0,725	0,003	> LOD	0,727	Sensible	/	
	3	Tampon	F	/	/	/	/	ND	Pas de sequensage	
	4	Tampon	H	/	/	/	/	ND	Pas de sequensage	
	4	Traitement contrôlé	A	1,282	> LOD	> LOD	1,282	Sensible	/	
	10	Tampon	F	0,004	/	/	0,004	Résistant	Y139C	Homozygote
	10	Traitement contrôlé	C	9,623	0,032	0,008	9,663	Résistant	Y139C	Homozygote
	10	Traitement contrôlé	A	12,019	0,146	0,010	12,175	Sensible	/	
	11	Traitement contrôlé	A	31,604	0,012	0,006	31,622	Résistant	Y139C	Hétérozygote
	11	Tampon		/	/	/	/	Résistant	Y139C	Homozygote
	11	Tampon		/	/	/	/	ND	Pas de sequensage	
	17	Tampon	H	0,020	/	/	0,020	Résistant	Y139C	Hétérozygote
	17	Traitement contrôlé	A	12,608	0,010	0,004	12,622	Sensible	/	
	17	Traitement contrôlé	C	4,558	0,114	0,038	4,709	Résistant	Y139C	Homozygote
	18	Traitement contrôlé	A	0,631	/	/	0,631	Sensible	/	
	18	Tampon	I	0,440	0,004	/	0,444	Sensible	/	
	18	Traitement contrôlé	D	6,909	0,049	0,042	7,000	Résistant	Y139C	Homozygote
	18	Tampon	H	0,005	/	/	0,005	Sensible	/	
	25	Tampon	H	0,004	/	/	0,004	Résistant	Y139C	Homozygote
	38	Traitement contrôlé	A	0,004	/	/	0,004	Résistant	Y139C	Homozygote
	38	Tampon	H	0,004	/	0,009	0,012	Résistant	Y139C	Hétérozygote
	38	Tampon	H	0,003	/	/	0,003	Sensible	/	
	39	Tampon	H	0,003	/	/	0,003	Résistant	Y139C	Homozygote

Malgré des valeurs moyennes deux fois plus élevées, les concentrations hépatiques, que ce soit en bromadiolone seule ou en AVKs toutes molécules confondues, ne sont pas significativement différentes entre les souris porteuses d'une mutation connue pour conférer une résistance (résistantes) et celles qui ne présentent pas une telle mutation (sensibles) (bootstrap BCa limit comparison, $p > 0,05$ et Wilcoxon Mann et Whitney, $p = 0,55$). Les concentrations hépatiques tout AVKs confondus pour les souris résistantes sont : min = 0,0 ; max = 31,62 ; med = 0,012 ; moy = 4,82 mg/kg. Celles pour les souris sensibles sont : min = 0,0 ; max = 12,62 ; med = 0,004 ; moy = 2,14 mg/kg (Figure 9).

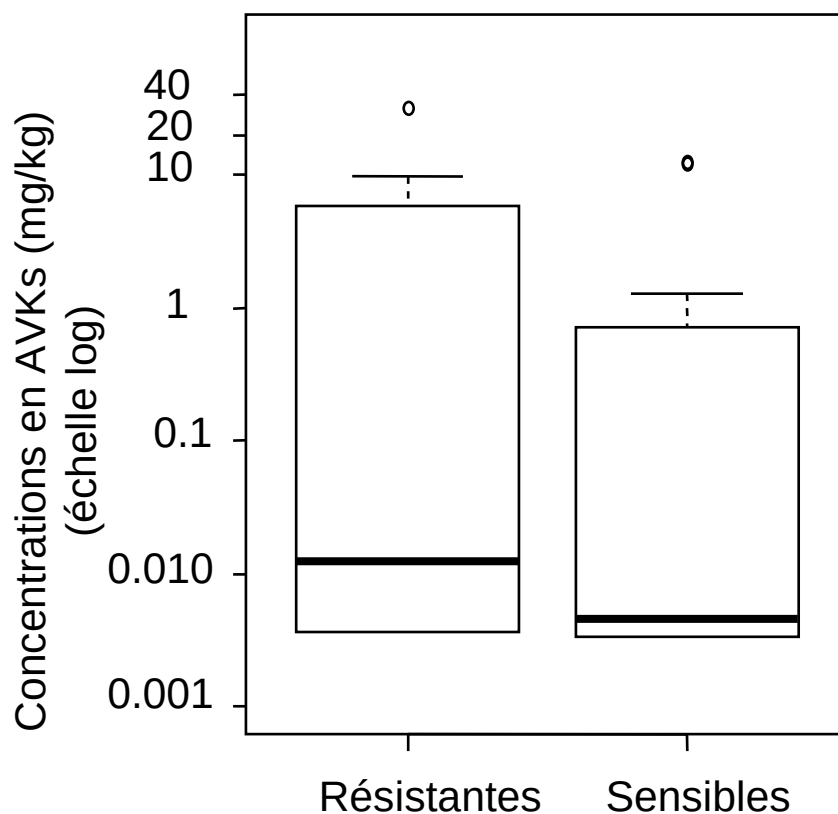


Figure 9. Concentrations hépatiques en mg/kg tous AVKs confondus pour les souris porteuses d'une mutation connue pour conférer une résistance aux AVKs (Résistantes) et celles non porteuses d'une telle mutation (Sensibles). Echelle logarithmique.

3.8 Exposition des espèces non cibles (crapauds)

Si au cours de l'étude préliminaire (novembre 2015) seuls des rongeurs ont été capturés, au cours de l'étude principale, 8 crapauds *Bufo guttularis* ont été capturés (2 avant traitement et 6 après traitement (J4 (1), J17 (2), J24 (1) et J39 (2)) sans que notre protocole de piégeage soit spécifique à cette espèce. Ils ont probablement été attirés par les nombreuses fourmis présentes sur les appâts Waxtag. Aucun des deux crapauds capturés avant traitement ne présentait de résidus d'AVKs détectables dans le foie. Par contre, 5 des 6 crapauds capturés après traitement étaient exposés avec des concentrations mesurées inférieures à 0,005 mg/kg pour 4 d'entre eux et égales à 0,05 mg/kg pour l'un d'entre eux capturé à J39.

4 DISCUSSION

4.1 *Persistance des appâts en nature*

Une partie de la population de rongeurs semble accéder relativement rapidement aux appâts puisque nous observons une consommation de ceux-ci dès le lendemain du traitement ainsi qu'une exposition de toutes les souris capturées sur la zone de traitement contrôlé dès la première session d'échantillonnages, 3 jours après distribution des appâts. Cette exposition semble se maintenir tout au long de l'étude puisque de nouveaux appâts sont encore partiellement ou entièrement consommés entre J33 et J39. Ceci semble également suggérer un maintien de l'appétence des appâts dans le temps. Si la consommation de ceux-ci et donc l'exposition des espèces cibles semble la plus importante dans les premières semaines qui suivent la distribution des appâts, nos observations laissent supposer une exposition continue pendant au minimum près de 40 jours après un traitement (fin du suivi). Ces appâts restent ainsi disponibles notamment pour des rongeurs résistants aux substances actives utilisées mais également pour des rongeurs recolonisant les parcelles traitées. Ces informations vont à l'encontre des présuppositions de la profession agricole qui présumait une disparition des appâts très rapidement après traitement.

4.2 *Persistance de la substance active dans les appâts*

Dans la mesure où les appâts sont enfermés dans des sachets qui restent hermétiques jusqu'à ce qu'un rongeur vienne les consommer, la persistance relativement longue de la substance active dans les appâts distribués en nature n'est pas surprenante. En l'absence de toute ouverture du sachet, les appâts restent en effet protégés de toute dégradation biologique, chimique ou physique telles que la transformation, la dégradation, la minéralisation, le lessivage ou la volatilisation habituellement observés lors de distribution de pesticides en nature (Jones *et al.* 1996 ; European Commission 2000). Même en l'absence de modélisation pour cette présente étude, selon les informations exposées sous forme graphique dans le paragraphe « Résultat », nous pouvons nous attendre à une $\frac{1}{2}$ vie de la bromadiolone probablement de plusieurs mois dans des appâts restés intacts. Pour la même substance active, une étude précédente avait montré une persistance relativement courte dans des appâts grains de blé distribués en plein champ dans des galeries artificielles. La $\frac{1}{2}$ vie de la bromadiolone était alors comprise en fonction de la saison entre 3,0 et 6,2 jours (Sage *et al.* 2007) pour des appâts qui étaient, dans ce cas, distribués dans le sol, à une quinzaine de cm de profondeur, directement en contact avec la terre et sans protection plastique. A notre connaissance, aucune autre étude ne s'est intéressée à la persistance des substances actives dans les appâts rodenticides distribués en nature. Il s'agit de ce fait des premières informations pour ce procédé de distribution.

Cette persistance relativement longue de la substance active dans les appâts restés intacts, entraîne inévitablement une exposition continue dans le temps pour les rongeurs résistants aux substances actives utilisées, mais également pour des rongeurs recolonisant les parcelles traitées. Ces informations vont à l'encontre des présuppositions de la profession agricole qui présumait une diminution des concentrations en substance active très rapide une fois les appâts distribués en nature. Une photosensibilité importante de la bromadiolone est souvent rapportée pour estimer une disparition rapide de la substance active dans les appâts distribués en nature. Nous devons cependant rappeler que les données de photosensibilité connues (ex. $\frac{1}{2}$ vie de 12,8 min à 25°C et au pH de 7,3 ; WHO 1995) ont été observées en milieu 100% aqueux.

4.3 Densités de rongeurs et efficacité de capture

Que ce soit au cours de l'étude préliminaire ou de l'étude principale, le succès de capture observé est relativement faible. En l'absence d'informations sur les densités des différentes espèces de rongeurs présentes, il nous est cependant difficile d'interpréter ces résultats. Malgré des recherches conséquentes, peu d'indices de présence de rongeurs (fèces, terriers, végétation consommée etc.) ont été observés. Aucune information sur les densités de rongeurs rencontrées en zone de canne à sucre sur l'île de la Réunion ne semble disponible dans la littérature. Ringler en 2013 puis Ringler *et al.* (2014), ont mesuré en milieu forestier réunionnais une densité de rats noirs de 3 à 15 rats/ha, suite à des sessions de Capture-Marquage-Recapture (CMR*). Le type de piège ainsi que les appâts différaient cependant de ceux que nous avons utilisé (trappes non létales).

Chaque capture de Rat noir a eu lieu à l'interface entre les friches et les cannes ainsi qu'en milieu forestier (transects D, I, J et K). Ces milieux considérés comme des milieux semi-ouverts à fermés, sont ceux rapportés par les agriculteurs pour servir de zone refuge aux rongeurs. Lors des différents échanges, la profession agricole ne nous a pas fait remonter d'information particulière quant à la présence de souris dans les plantations de canne et des dégâts qu'elles auraient pu occasionner. Il s'agit pourtant de l'espèce qui a été capturée en majorité.

Les souris ont été capturées principalement le long de friche (transect H, n=7), on suppose que les souris sont plus présentes dans les friches que les rats. Au vu de la position du transect H, les souris peuvent potentiellement provenir de la zone forestière située plus au sud. L'absence de capture sur le transect E pourrait être expliqué par une densité de rongeurs faibles sur cette zone (traitement non contrôlé environ 1 mois avant notre traitement), mais il est à noter qu'aucune capture ne s'est produite également sur d'autres transects (ex. transect G).

Notre étude principale (février - mars) a été réalisée au cours de la période cyclonique, synonyme d'une forte pluviométrie. Les captures de souris ont eu lieu lorsqu'il n'y avait pas ou très peu plu (résultats non montrés). Ringler en 2013, a montré qu'en moyenne sur trois îles étudiées sous le même contexte climatique, les densités diminuent de moitié entre la saison des pluies et la saison sèche, bien que ces diminutions saisonnières ne soient significatives que sur une seule île (Europa). La présence de fourmis rouges pourrait expliquer également la diminution de l'attractivité de nos appâts. Effectivement, celle-ci recouvraient les Waxtag de terre, les rendant moins attractifs. Les Naralure®, semblaient quant à eux mieux résister dans le temps et les fourmis rouges ne les recouvraient pas.

Enfin, nous attirons l'attention sur un biais que nous pouvons supposer comme important quant à l'utilisation dans notre étude de tapettes en bois. En effet, du fait de conditions climatiques très pluvieuses (578 à 744 mm / mois) et de températures relativement élevées (24,8°C en moyenne), celles-ci se sont retrouvées très rapidement moins efficaces à la capture (rouille du ressort et du mécanisme de déclenchement, bois gondolé, levier de la tapette qui ne terminait pas sa course lors du déclenchement, tapette probablement déclenchée par la pluie etc.). De nombreuses tapettes ont été retrouvées détendues sans qu'aucun animal n'ait été capturé. Ces observations avaient déjà été réalisées lors de l'étude préliminaire. Pour des raisons budgétaires, il ne nous a cependant pas été possible de changer de dispositif de capture pour l'étude principale. Ceci a pu conduire à un faible succès de capture. Une utilisation de tapettes en plastique tel que préconisé après l'étude préliminaire aurait probablement permis d'augmenter considérablement le succès de capture sans nécessité de moyens humains plus importants.

4.4 Exposition des rongeurs cibles – cinétique et dispersion spatiale

Etude préliminaire (novembre 2015)

Les trois substances actives bromadiolone, difénacoum et brodifacoum détectées dans la population de souris capturées lors de l'étude préliminaire reflètent une exposition des rongeurs sur le long terme, y compris en l'absence de traitement récent connu. Au regard des discussions avec la profession agricole, il s'agit des 3 substances actives qui semblent les plus utilisées lors de traitements rodenticides en canne à sucre sur l'île. Une multi-exposition des espèces cibles à plusieurs substances actives sont également décrites dans d'autres publications (Elmeros *et al.* 2011 ; Ruiz-Suárez *et al.* 2014). Parmi les souris capturées, toutes présentaient des concentrations hépatiques en AVKs faibles (<0,04 mg/kg) à l'exception d'une qui présentait des concentrations hépatiques compatibles avec une intoxication (1,7 mg de bromadiolone / kg). La warfarine retrouvée dans un des rats noirs capturé est la molécule AVKs la plus ancienne encore commercialisée et pour laquelle seulement 21 formulations commerciales sont autorisées en Europe (Allemagne, Autriche et Pologne – ECHA 2017). Il est donc surprenant de la retrouver dans les animaux échantillonnés sur l'île.

Etude principale (février - mars 2016)

La réalisation d'un traitement par un agriculteur quelques semaines avant notre étude (zone de traitement non contrôlé au nord de la zone tampon) ne semble pas interférer avec nos résultats puisque aucun des rongeurs capturé avant notre traitement ne contient de résidus hépatiques détectables de bromadiolone, ni même d'autres AVKs. Sur cette base nous pouvons supposer que tous les résidus d'AVKs mesurés lors de notre étude reflètent uniquement l'exposition induite par notre traitement.

En zone de traitement, tel qu'énoncé précédemment, l'exposition des souris intervient très rapidement après distribution des appâts pour atteindre une concentration maximale modélisée 9,5 jours après le traitement. L'exposition des prédateurs se nourrissant de rongeurs sur ces parcelles semble de ce fait, la plus importante pendant une vingtaine de jours après traitement. Si cette exposition se maintient *a minima* jusqu'à la fin de l'étude (J39), elle tend à devenir plus faible en diminuant progressivement, pour revenir à des concentrations faibles mesurées dans le foie des souris capturées (<0,005 mg/kg entre J25 et J39).

Cette cinétique d'exposition semble comparable à celle connue lors d'un traitement en plein champ pour contrôler les populations de campagnol terrestre en zone de moyenne montagne en Europe de l'ouest (Sage *et al.* 2008). Les concentrations maximum semblent cependant atteintes légèrement plus tard : 9,5 jours modélisés dans la présente étude contre 5,6 - 6,5 jours pour les rongeurs capturés en profondeur et 2,8 – 3,5 jours pour les rongeurs capturés en surface dans l'étude de Sage *et al.* (2008). Ceci pourrait s'expliquer par un accès aux appâts beaucoup plus rapide dans le cadre d'une distribution directement dans les galeries des rongeurs comme c'est le cas dans l'étude citée précédemment pour les campagnols terrestres et les campagnols des champs. Dans notre présente étude, l'exposition des rongeurs semble se prolonger jusqu'à la fin de notre suivi (J39) mais avec des concentrations hépatiques faibles (< 0,005 mg/kg mesurés à J39) à comparer de celles mesurées à la même période dans le foie de campagnols piégés en surface lors de l'étude précédemment citée (2 à 10 mg/kg). Dans l'étude sur campagnols, une exposition à très long terme avait été montrée puisqu'un individu capturé 135 jours après traitement montrait une concentration hépatique de 16,6 mg/kg. Si dans le contexte réunionnais, une exposition sur le long terme peut être également suspectée (individus positifs capturés lors de l'étude préliminaire en absence de traitements connus), elle semble être présente dans une moindre mesure.

A noter que les concentrations ont été mesurées sur des individus capturés vivants et non retrouvés morts intoxiqués sur le terrain. Ceci suppose qu'il y a déjà eu une dégradation des substances actives par exemple par métabolisation. En effet, Poché (1988) ont montré qu'après une exposition à la bromadiolone pendant 1,2,3 et 4 jours, des souris montraient des résidus dans le corps de 2,29 mg/kg après 24h, 0,93 mg/kg après 48h, 0,78 mg/kg après 72h et 0,58 mg/kg après 96h. Ces résultats montrent une phase d'élimination de la molécule rapide puis graduée dans le temps.

Le temps imparti à l'étude ne nous a pas permis d'ajuster un modèle sur les données observées en périphérie des parcelles traitées (zone tampon). Un pattern similaire à celui de la zone de traitement contrôlé semble cependant observé avec un pic de concentrations maximum qui serait très probablement légèrement décalé dans le temps (concentrations maximum 17 jours après le traitement) et des concentrations maximum qui restent beaucoup plus faibles qu'en zone traitée (<1 mg/kg). Ce décalage dans le temps pourrait correspondre au temps nécessaire au déplacement des animaux exposés entre les deux zones traitées et non traitées. Si une dispersion spatiale des rongeurs semble être possible, sans être nulle, l'exposition de prédateurs se nourrissant de rongeurs en périphérie proche (50 à 100 m) de zones traitées semble beaucoup plus faible que sur les zones traitées. Le risque d'exposition pour le Busard de Maillard semble donc principal sur les zones traitées. Une meilleure connaissance des distances de dispersions des rongeurs en fonction des habitats et des saisons pourrait cependant s'avérer pertinente.

4.5 Résistance des espèces cibles

Que ce soit au cours de l'étude préliminaire (novembre 2015) ou de l'étude principale (février - mars 2016), aucun des rats capturés n'a montré de mutation connue pour conférer une résistance aux AVKs. Nous attirons cependant l'attention sur un faible nombre d'individus échantillonnés (7 + 4 respectivement). Sur les 30 souris qui ont pu être génotypées (9 lors de l'étude préliminaire et 21 lors de l'étude principale), 17 (57%) étaient porteuses de la mutation Y139C dont 13 (43%) homozygotes. Malgré des concentrations moyennes en bromadiolone deux fois supérieures dans les foies des souris résistantes par rapport à celles sensibles lors de l'étude principale (4,82 et 2,14 mg/kg, respectivement), notre étude n'a pas permis de vérifier statistiquement le fait que des rongeurs résistants contiennent des résidus plus élevés en AVKs que les rongeurs sensibles. Cette absence de significativité peut probablement être attribuée à un effectif relativement faible et à une grande variabilité des résidus observés entre individus. La tendance mesurée dans notre étude confirme les craintes exposées, à savoir un risque plus important d'exposition pour des prédateurs se nourrissant de rongeurs résistants par rapport à des rongeurs sensibles. En complément de différences de concentrations, plusieurs études réalisées en captivité ont montré que des rongeurs résistants exposés à de la chlorophacinone (Vein *et al.* 2013) ou à du difénacoum (Atterby *et al.* 1999) survivent plus longtemps et sont donc plus longtemps disponibles pour les prédateurs. Shore *et al.* (2013) en a apporté une première preuve *in situ*, les chouettes effraies provenant de régions du Royaume-Uni où les rongeurs sont résistants aux AVKs sont plus susceptibles d'avoir des résidus hépatiques de molécules de seconde génération détectables, que les chouettes de régions où la résistance n'a pas été détectée.

La mutation Y139C retrouvée dans notre étude est connue pour conférer une résistance forte aux molécules de 1^{ère} génération (e.g. chlorophacinone, coumafène, coumatétralyl) mais également aux molécules de 2^{nde} génération les plus anciennes telles que la bromadiolone et le difénacoum (Rowe *et al.* 1981 ; Greaves *et al.* 1982 ; MacNicoll & Gill 1987 ; Johnson 1988 ; RRAC 2015,). Par conséquent, une très faible efficacité du traitement est attendue sur la population de souris lors de l'utilisation d'appâts contenant l'une ou l'autre de ces 5 substances actives. Pour contrôler de manière chimique les populations de souris

mutées Y139C, parmi les AVKs, seuls ceux de dernière génération (le brodifacoum, le flocoumafène et la diféthialone) restent efficaces. D'autres substances actives avec un mode d'action différent peuvent être envisagées (e.g. un hypnotique tel que l'alphachloralose), mais présentent souvent deux inconvénients majeurs : une mortalité rapide après ingestion et donc une faible efficacité à l'encontre du rat néophobe, ainsi que l'absence d'antidote.

Si pour des raisons d'efficacité il serait nécessaire de recourir aux molécules de dernière génération, celles-ci présentent une toxicité plus élevée également pour les espèces non cibles et notamment les rapaces, ainsi qu'un risque de transfert dans la chaîne alimentaire plus important du fait d'une persistance plus longue dans les tissus des rongeurs (e.g. Erickson et Urban 2002 ; WHO 1995). D'après les résultats obtenus par Defrance (2014), lors d'une ingestion non létale, la diféthialone et le brodifacoum sont retrouvés pendant au moins 6 à 8 mois après traitement dans des foies de rats en bonne santé apparente, augmentant ainsi le risque d'exposition secondaire pour les prédateurs.

4.6 Exposition des espèces non cibles (crapauds)

Les faibles concentrations mesurées dans 5 des 6 crapauds *Bufo guttularisa* capturés après traitement montrent, même s'il semble faible, l'existence d'un transfert à cette espèce. Cette exposition peut probablement s'opérer de 2 manières : soit par consommation directe d'appâts ou d'éléments au contact des appâts (terre), soit par consommation de proies invertébrées qui ont été exposées aux appâts. Lors de notre étude, les fourmis ont notamment été observées en train de consommer des appâts. Dans d'autres études, de nombreux invertébrés (arthropodes, mollusques, lombrics) ont été observés mangeant des appâts contenant du monofluoroacétate de sodium ou du brodifacoum, lors des opérations de contrôle de populations de possum ou de rats en Nouvelle Zélande (Notman 1989, Wright & Eason 1991, Pierce et Montgomery 1992, Lloyd et Hackwell 1993, Spurr 1994, Eason et Spurr 1995, Morgan *et al.* 1996, Spurr 1996, Ogilvie *et al.* 1997, Booth *et al.* 2003). Même si les anticoagulants ne sont pas considérés comme toxiques pour les invertébrés (Eason et Spurr 1995), des résidus relativement élevés par exemple de brodifacoum (1 mg/kg) ont été retrouvés dans les tissus de nombreux organismes (e.g. coléoptère, blatte, escargot, vers de terre). C'est pourquoi plusieurs auteurs considèrent que les invertébrés pourraient être une source d'exposition secondaire de la faune non cible. Les concentrations mesurées dans les foies des crapauds capturés dans notre étude semblent relativement faibles (0,005 à 0,05 mg/g). Le Busard de Maillard se nourrissant très probablement d'invertébrés et/ou de reptiles, il apparaît cependant nécessaire de mieux décrire cette voie d'exposition.

4.7 Implications pour le Busard de Maillard

En complément de la cinétique des résidus d'AVKs dans les populations de rongeurs après traitement, la disponibilité de ces substances actives pour les prédateurs est déterminée par différents facteurs, tels que l'évolution des densités de rongeurs après un traitement, l'accessibilité des proies pour un prédateur ainsi que la distribution des substances actives dans les tissus des rongeurs.

4.7.1 Evolution des densités de rongeurs après traitement.

L'évolution dans le temps du succès de capture (nombre de rongeurs capturés par nuit piège) semble varier de manière très faible. Elle oscille par exemple entre 2 et 4 souris capturées par session de 2 nuits de piégeage successif entre J3 et J39. Du fait de variations

relativement faible, il nous semble difficile d'interpréter ces données d'une manière plus approfondie. Lorsque les espèces cibles ont accès rapidement aux appâts, les informations disponibles dans la littérature (e.g. Grolleau *et al.* 1989, Sage *et al.* 2008) nous laissent supposer une mortalité des individus exposés entre 3 et 10 jours après ingestion d'une dose létale d'AVKs et un maximum de mortalité de différentes espèces de rongeurs entre 6 à 7 jours après un traitement. Sur une parcelle traitée, les densités de rongeurs sont donc supposées être maximales dans la 1^{ère} semaine qui suit un traitement. Notre étude relative à la disparition des appâts distribués en nature montre cependant une présence très probable de rongeurs sur les parcelles traitées jusqu'au minimum à la fin de notre suivi (J39), puisque lors de chaque relevé précédent cette date, de nouveaux appâts percés ou disparus ont été signalés.

4.7.2 Accessibilité des proies

La probabilité qu'un rongeur soit capturé par un prédateur ou un charognard est déterminante en matière de risque d'exposition secondaire (Brakes et Smith 2005). Nous ne disposons que de peu d'informations relatives aux habitudes alimentaires du Busard de Maillard (prédateur et/ou charognard). Aussi nous envisagerons les 2 scénarios. Pour un prédateur qui ne consommerait que des proies vivantes, nous supposons une accessibilité à celles-ci continue tout au long de l'étude mais qui semble maximale durant les 15-20 premiers jours qui suivent un traitement.

Seul un rat a été retrouvé mort en surface au cours de notre étude sans que l'on puisse établir les raisons de sa mort (empoisonnement ou capture par un prédateur). Nous disposons donc de très peu d'informations quant à la disponibilité de cadavres de rongeurs morts en surface pour une espèce qui consommerait également les cadavres de rongeurs.

Les AVKs de seconde génération, comme c'est le cas de la bromadiolone sont généralement définis comme actifs après une seule ingestion (Kolf-Clauw *et al.* 1995). Cependant, du fait d'un temps d'action différé chez les animaux exposés et de la persistance élevée de la substance active dans les appâts, les rongeurs peuvent continuer à consommer des appâts dans des quantités supérieures aux doses nécessaires pour provoquer leur mort et ainsi contribuer à augmenter les résidus disponibles dans leurs tissus pour les prédateurs. Le délai d'action des molécules peut permettre aux rongeurs de se cacher lorsqu'ils ressentent les premiers symptômes (Record et Marsh 1988) et être ainsi moins disponibles pour des prédateurs ou charognards se nourrissant en surface. D'un autre côté, Saucy *et al.* (2001) ont montré dans une étude similaire en plein champ que 38% des campagnols terrestres empoisonnés mourraient en surface plutôt que dans leurs terriers. Si à notre connaissance aucune étude n'est disponible spécifiquement sur le rat dans ce contexte de traitement, Thomas *et al.* (2011) ont montré que les rongeurs mouraient majoritairement en surface et de nombreuses observations de terrain dans différents contextes (Sage obs. pers.) confirment ces résultats. De plus, des rongeurs empoisonnés et moribonds présentent très probablement un risque plus important de se faire capturer que des rongeurs non exposés, du fait de leur diminution de réflexe de fuite. S'il ne nous a pas été permis d'apporter des informations sur ce sujet au cours de notre étude, il a cependant été montré que cela pourrait contribuer à une augmentation de proies exposées aux rodenticides dans le régime alimentaire des prédateurs par rapport à des proies non exposées (Cox et Smith 1992).

4.7.3 Distribution des AVKs dans les tissus

Notre étude a été centrée uniquement sur le dosage des AVKs dans le foie des animaux capturés. Il s'agit en effet de l'organe connu pour stocker les xénobiotiques dans des concentrations les plus élevées. En fonction des études et du délais entre l'ingestion

d'appâts et la capture de l'animal, le foie contient entre 25 et 71% des résidus disponibles dans la totalité du corps (Brakes et Smith 2005 ; Giraudoux *et al.* 2006 ; Sage *et al.* 2008). Les concentrations les plus faibles sont en général observées dans le tube digestif dans la mesure où l'animal n'a pas été capturé tout de suite après ingestion des appâts. L'exposition des prédateurs aux AVKs peut donc varier légèrement en fonction des habitudes alimentaires des prédateurs (e.g. consommation du foie en 1^{er} et tube digestif laissé ou non de côté). Des connaissances plus précises sur les habitudes alimentaires du Busard de Maillard permettraient d'intégrer au mieux ce risque.

4.7.4 Simulation d'exposition pour le Busard de Maillard et évaluation du risque

La présence de résidus de bromadiolone dans le foie de 18 souris parmi les 21 capturées après le traitement démontre un risque d'exposition pour le busard. Ce risque semble présent *a minima* pendant près de 40 jours après un traitement, notamment sur les zones traitées et dans une moindre mesure en périphérie de celles-ci. Une exposition à bas bruit des rongeurs a également été montrée en l'absence de traitement connu lors de l'étude préliminaire de novembre 2015. Il semble cependant que le risque soit maximum dans les 15 à 20 jours qui suivent un traitement, avec des concentrations maximales prédites à l'échelle de la population de rongeurs de 11,4 mg/kg de foie 9,5 jours après le traitement (modèle qui exprimait au mieux nos données, modèle n°2).

Si pour les raisons énoncées précédemment, nous pouvons supposer une efficacité de capture pour le busard qui serait plus importante sur les parcelles traitées que sur les zones périphériques (réduction de fuite des rongeurs intoxiqués), nous n'avons à notre connaissance aucune information des habitudes de chasse du busard (type d'habitats, saisonnalité, type de proies...). De même, un nombre trop faible de rat a été échantillonné au cours de notre étude et les concentrations mesurées dans la faune non cible (crapauds) restent relativement faibles. Pour ces raisons et afin d'établir un scénario d'exposition le moins biaisé possible, nous n'intégrerons pas dans notre analyse les valeurs mesurées chez les rats ou les crapauds, mais nous conserverons l'ensemble des informations mesurées dans la population échantillonnée de souris, qu'elles aient été capturées dans ou autour de la zone de traitement contrôlé. Nous attirons l'attention sur le fait qu'en l'absence d'informations précises sur le régime alimentaire du Busard de Maillard, nous ne pouvons spécifier si la souris est une espèce proie pour celui-ci.

A notre connaissance, peu d'informations sont disponibles sur la quantité de nourriture ingérée par jour par le busard et aucune information n'est disponible sur la dose létale de la bromadiolone ou d'autres AVKs chez cette espèce. Pour ces raisons, nous nous baserons sur une extrapolation des informations relatives aux quantités de nourriture ingérées par jour par la buse variable (170g / jour pour une buse d'environ 1 kg, Giraudoux *et al.* 2006) et aux données de toxicité les plus faibles recensées chez une espèce d'oiseau (DL₅₀* chez le Colin de Virginie = 138 mg de bromadiolone par kg de masse corporelle).

Par extrapolation pour un busard d'environ 500 g, nous supposons une quantité de 85g consommés par jour. Ceci correspond à 67 foies de souris (masse moyenne d'un foie dans notre étude : 1,27 g) ou à 5,8 souris entières (masse moyenne d'une souris dans notre étude : 14,5 g). Si un busard ingérait uniquement des foies, cela conduirait à une exposition de 0,97 mg de bromadiolone par jour. Sage *et al.* (2008) ont montré que lors d'un traitement en plein champ, en moyenne 59% de la bromadiolone corporelle d'un campagnol terrestre était présente dans le foie. En l'absence d'autres informations, par extrapolation, nous pouvons supposer une quantité ingérée par un busard se nourrissant de souris entière de l'ordre de 0,145 mg de bromadiolone par jour. Ces doses prévisibles d'exposition foie ou corps entier sont respectivement 78 et 523 fois inférieures à la DL50 pour le Colin de Virginie. Elles sont par contre respectivement 17,3 et 2,6 fois supérieures à la dose ayant

entraîné la mort de tous (n=7) les Grands-ducs d'Amérique lors d'une exposition en laboratoire pendant 7 jours à des rats intoxiqués à la bromadiolone (LD₁₀₀ : 0,056 mg/kg/jour ; Kemikalieinspektionen 2006). Plusieurs auteurs ont, en effet, démontré une sensibilité plus importante chez les rapaces (falconidés et strigiformes) par exemple pour un autre AVK, la diféthialone (Rattner *et al.* 2011). Des effets non létaux surviennent très souvent à de faibles doses d'exposition notamment lors d'expositions répétées (Berny 2007 ; Coeurdassier *et al.* 2012 ; European Commission 2002 ; Kolf-Clauw *et al.* 1995).

Cette étude a été réalisée sur une surface d'étude de 27 ha dont 6 traités, mais les opérations de contrôle des populations de rongeurs en canne à sucre sont mises en place sur des surfaces beaucoup plus vastes à l'échelle de l'île (24 000 ha de canne à sucre cultivés lors du recensement agricole de 2010) et ne concernent pas uniquement ce type de culture (traitements rodenticides mis en place sur d'autres cultures ou encore des espaces urbanisés et périphéries des villes et villages etc.). Si nous n'avons aucune information à ce sujet, il est probable que ces habitats soient également des zones de chasse du busard.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour la première fois, une étude s'est intéressée aux modalités de transfert entre appâts, rongeurs cibles, espèces non cibles et prédateurs dans un contexte de traitement rodenticides en plantation de canne à sucre. En complément des résultats énoncés dans l'étude, plusieurs points importants ont été identifiés.

- Dans le cas de la réalisation de nouvelles études, et afin d'améliorer le succès de capture de rongeurs, l'utilisation de tapettes en bois devra être proscrite. Une sélection attentive de pièges efficaces devra être réalisée en amont de toute nouvelle étude visant à capturer des rongeurs en extérieur.
- Notre étude s'est déroulée à une échelle parcellaire dans le contexte d'un traitement rodenticide en canne à sucre à une saison donnée. Dans ce contexte, l'exposition du Busard de Maillard aux rodenticides ne semble pas négligeable, mais aucune information ne nous permet d'extrapoler notre travail à d'autres habitats et d'autres saisons. Il apparaît nécessaire de pouvoir apporter des informations concrètes quant aux habitudes de chasse du busard (habitats de chasse, espèces proies ingérées, saisonnalité, tissus consommés ou délaissés...). Dans cette continuité, il semble pertinent de poursuivre la mesure d'exposition des espèces proies potentielles dans d'autres habitats et à d'autres saisons, tout en améliorant considérablement les connaissances relatives à la présence de souches de rongeurs résistants sur l'île.
- Au regard des mutations retrouvées dans la population de souris échantillonnées (81% porteuses de la mutation Y139C connue pour conférer une forte résistance aux AVKs dont notamment bromadiolone et difénacoum), la plupart des traitements rodenticides pourraient s'avérer très peu efficaces tout en augmentant le risque d'exposition des espèces non cibles. Ceci pourrait être très dommageable que ce soit en matière de gestion sanitaire (zoonoses transmises par les rongeurs), agro-économique (dégâts aux cultures) et écotoxicologique (transfert des substances actives aux espèces non cibles). Il apparaît de ce fait important d'engager une réflexion conjointe entre les différentes structures concernées quant à la pérennité de l'efficacité des traitements, leur écotoxicité et le risque d'exposition des prédateurs.

Rongeurs - Axe 2 : Exposition aux rodenticides à une échelle spatiale large sur 6 sites différents, d'une des espèces de rongeur cible : le Rat noir.

- Exposition aux rodenticides de 100 rats noirs collectés sur 6 sites répartis sur l'île et présentant des habitats naturels différents,
- Variation de cette exposition en fonction de la saison (saison sèche ou saison humide) ainsi qu'éventuellement d'autres paramètres individuels (ex. âge ou sexe du rongeur),
- Implication pour l'exposition secondaire du Busard de Maillard.

Synthèse des principaux éléments :

- Sur les 100 Rats noirs collectés entre février et octobre 2013 et analysés, 9 montrent au minimum une substance active rodenticide AVK détectable dans le foie et 91 sont négatifs.
- Sept rats sont exposés à un seul AVK, tandis qu'un est multi-exposé à 2 AVKs et un autre à 3 AVKs.
- Les AVKs retrouvés sont la chlorophacinone (n=3), la bromadiolone (n=7), le difénacoum (n=1) et le brodifacoum (n=1) avec des concentrations médianes croissantes pour chacune de ces substances actives.
- Aucune différence de concentration n'est observée entre les mâles et les femelles ou entre les 2 saisons d'échantillonnage (février – avril et juillet – octobre).
- Sur les 8 lieux de prélèvements, seuls 3 présentent des échantillons positifs. Il s'agit de la Rivière des roches (front de mer), du Chemin Feoga et de l'Etang St Paul.
- Ces sites sont situés dans un environnement relativement peu anthropisé (hors zone urbanisée intense et zones de culture). Deux sont situés en bas de bassin versant, un semble être une zone d'activité d'élevage bovins, porcins et volaille.
- Les concentrations hépatiques mesurées au cours de cette étude sont très faibles et ne semblent pas compatibles avec des doses létales pour des rats. Sans connaissance de dates de traitement sur les sites d'étude, il nous est difficile de discuter de manière plus approfondie les concentrations mesurées.
- Nos résultats montrent qu'il peut exister une exposition sublétales du Rat noir aux rodenticides AVKs. La proportion de rats noirs exposés est cependant globalement faible (9%) et aucune exposition n'a par ailleurs été détectée chez cette espèce dans 5 des 8 zones échantillonnées.
- Une exposition aux rodenticides est donc possible pour les prédateurs de Rat noir, dont le Busard de Maillard. Au regard de cette étude, nous pouvons cependant supposer que cette exposition reste faible.
- Toutefois, cette étude n'est réalisée sur une seule espèce de rongeur susceptible de rentrer dans le régime alimentaire du busard. Celle-ci reste très néophobe et donc probablement moins exposée aux appâts rodenticides que d'autres espèces.
- **Les analyses ont été réalisées sur des individus collectés de manière opportuniste en exploitant des échantillons acquis dans le cadre d'un protocole de capture défini dans un objectif d'évaluer le risque de transfert de pathogènes à l'Homme. Un échantillonnage prévu spécifiquement dans l'objectif de mesurer l'exposition du Busard de Maillard aux rodenticides pourrait par la suite être intéressant à mettre en œuvre sur des sites de chasse, de reproduction ou de forts enjeux de conservation pour cette espèce.**

1 OBJECTIF ET CONTEXTE DE L'ETUDE

1.1 Objectif

L'objectif de cette étude a été de mesurer l'exposition aux rodenticides AVKS de Rats noirs (*Rattus rattus*) échantillonnés à deux saisons différentes sur six sites répartis sur l'île et présentant des caractéristiques paysagères différentes, sans connaissance préalable des conditions de traitements rodenticides sur ou à proximité des sites d'échantillonnages.

1.2 Contexte

Les individus étudiés ont été capturés en 2013 dans le cadre d'une étude réalisée par l'Unité Mixte de Recherche PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical) de l'Université de La Réunion. Parmi les échantillons disponibles (554 individus), 100 ont été analysés.

Les analyses toxicologiques ont été réalisées par Isabelle Fourel, USC 1233 Rongeurs sauvages – INRA VetAgro Sup Lyon.

Centrée sur une seule espèce et sur six sites différents répartis au nord-ouest et à l'est de l'île, il s'agit ici d'une étude préliminaire. A notre connaissance, cette étude est la première sur l'île à s'être intéressée à la mesure à large échelle et à deux saisons différentes de l'exposition d'une espèce entrant dans le régime alimentaire du Busard de Maillard.

2 METHODOLOGIE

2.1 Sites d'étude et protocole d'échantillonnage

Une recherche de résidus de rodenticides anticoagulants a été effectuée dans le foie de rats noirs (*Rattus rattus*) capturés dans le cadre d'une étude dirigée par l'UMR PIMIT Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical de l'Université de La Réunion, CNRS 9192, INSERM 1187, IRD 249. Cette étude avait pour objectif de déterminer la distribution géographique de pathogènes au sein de la population de micromammifères à l'échelle de l'île. Des prélèvements ont été réalisés entre novembre 2012 et novembre 2013 sur 20 sites différents. Les espèces capturées étaient la Souris domestique (*Mus musculus domesticus*), le Rat surmulot (*Rattus norvegicus*), le Rat noir (*Rattus rattus*), la Musaraigne Grande Pachyure (*Suncus murinus*) et le Tangué (*Tenrec eucaudatus*). Ne disposant que d'un budget analytique limité, il a été choisi d'orienter cette étude sur une seule de ces espèces : le Rat noir. Une sélection de 100 échantillons a alors été effectuée sur 6 sites différents pour des Rats noirs capturés entre février et octobre 2013, en ciblant plus spécifiquement les individus adultes. Deux saisons ont été retenues : la saison chaude et humide pour des animaux capturés entre le 6 février et 25 avril, et la saison froide et sèche pour des animaux capturés entre le 23 juillet et le 30 octobre. Les 6 sites retenus sont présentés ci-dessous. Le nombre d'échantillon retenu pour chaque site est précisé entre parenthèses.

A l'ouest de l'île :

- Etang St Paul (18),
- RF Bois de Nefles (16),
- Chemin Féoga (15).

A l'est de l'île :

- Rivière des Roches en bord de mer (18),
- Plantation Melissa (15),
- Grand Etang (11),
- Plaine des Palmistes (7).

Chaque site est présenté en Figure 11 et a été décrit par l'équipe PIMIT de la manière suivante :

- Les sites de la Rivière des Roches et de l'Etang St Paul sont en bas de bassins versants.
- Le chemin Feoga est un site d'altitude (1000m) avec une activité d'élevage (porcin et volaille) importante.
- Grand étang est une zone humide avec peu d'habitations et de cultures à proximité immédiate.
- Les autres sites sont des sites de moyenne altitude relativement préservés et avec peu d'activités anthropiques à proximité (habitations / cultures).

Le protocole de capture mis en œuvre était le suivant : sur chaque site, entre 40 et 80 pièges non létaux (nasses ou pièges Sherman) étaient placés en ligne à une distance d'environ 15 mètres chacun. Chaque piège était appâté l'après midi et pendant 3 nuits consécutives avec de la noix de coco ou un mélange de beurre de cacahuète et d'huile de sardine. Chaque matin, les pièges étaient relevés et les animaux capturés étaient apportés au laboratoire.

2.2 Analyses toxicologiques

Les animaux ont été disséqués par l'UMR PIMIT. Les foies ont été conservés séparément à -20°C jusqu'à analyse. La méthode analytique utilisée est décrite par Fourel *et al.* (2016) et utilise une chaîne analytique LC-MS/MS, méthode qui combine la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Cette méthode a été partiellement décrite dans le premier chapitre de ce rapport « Rongeurs - Axe 1 : Exposition des rongeurs cibles après un traitement rodenticide en canne à sucre – écotoxicologie et résistance ». Elle permet de doser simultanément les huit substances actives homologuées en Europe pour les produits rodenticides AVKs (le coumafène, le coumatétralyl, la chlorophacinone, la bromadiolone, le difénacoum, le flocoumafène, le brodifacoum et la diféthialone). Ce sont les substances actives les plus couramment utilisées dans le monde en tant que rodenticide. Une courbe de calibration a été réalisée et a permis la quantification des différents AVKs dans les échantillons. La LOQ (Limit Of Quantification) correspond au point le plus bas de la courbe de calibration, elle est ici comprise selon les substances actives entre 1 et 2 ng/g. La LOD (Limit Of Detection) a été définie comme la moitié de la LOQ soit entre 0,5 et 1 ng/g.

3 RESULTATS

Sur les 100 échantillons analysés, 9 (9%) montrent au minimum une substance active rodenticide AVK détectable et 91 (91%) sont négatifs.

Sur les 26 échantillons collectés entre février et avril (6 février – 25 avril soit sur une durée de 78 jours), 4 sont positifs (15,4%). Sur les 74 échantillons collectés entre juillet et octobre (23 juillet – 30 octobre soit 100 jours), 5 sont positifs (6,8%). Aucune différence statistique n'est cependant notée entre les concentrations observées entre les deux saisons d'échantillonnage (Wilcoxon - Mann et Whitney, $p > 0,05$).

Les AVKs retrouvés sont la chlorophacinone ($n=3$) avec une concentration médiane pour les positifs de 5,1 ng/g (min = 3,6 ; max = 73,8 ; $Q1 = 4,3$; $Q3 = 39,5$), la bromadiolone ($n=7$) avec une concentration médiane pour les positifs de 14,8 ng/g (min = 10,1 ; max = 442,4 ; $Q1 = 11,8$; $Q3 = 6,0$), le difénacoum ($n=1$) avec une concentration de 146 ng/g et le brodifacoum ($n=1$) avec une concentration de 641 ng/g. Sept rats sont exposés à un seul AVK, tandis qu'un est multi-exposé à 2 AVKs et un autre à 3 AVKs.

Sur les 8 lieux de prélèvements, 5 ne présentent aucun échantillon positif. Trois présentent des échantillons positifs. Il s'agit de la Rivière des roches (front de mer), du Chemin Feoga et de l'Etang St Paul. Les résultats pour ces 3 sites sont présentés plus en détail ci-dessous.

- **Rivière des roches front de mer** : 4 échantillons sur 18 collectés sur ce site (soit 22% dont 2 collectés en février et 2 en juillet) présentent des résidus d'AVKs. Ce lieu est le seul à comporter des rats multi-exposés avec 1 individu exposé à la bromadiolone et au brodifacoum, et 1 à la chlorophacinone, la bromadiolone et le difénacoum. Parmi les 4 individus présentant des résidus de rodenticides, 3 individus contiennent de la chlorophacinone (3,6 ; 5,1 et 3,8 ng/g), 2 de la bromadiolone (76 et 442 ng/g), 1 du difénacoum (146 ng/g) et 1 du brodifacoum (641ng/g)..
- **Chemin Feoga** : 2 échantillons sur 15 collectés sur ce site (soit 13%) présentent des résidus d'AVKs avec uniquement de la bromadiolone détectée (10 et 76 ng/g) sur des rats prélevés en mars. Les rats prélevés à la seconde saison ($n=6$) sont négatifs.
- **Etang St Paul** : 3 échantillons sur 18 collectés sur ce site (soit 16%) présentent des résidus d'AVKs avec uniquement de la bromadiolone détectée (10, 13 et 14.8 ng/g) sur des rats prélevés en octobre. Sur ce site, aucun échantillon collecté au printemps n'a été analysé.

Aucune différence de concentration en AVKs n'est observée entre les mâles et les femelles ou entre les 2 saisons d'échantillonnage (Wilcoxon - Mann et Whitney, $p > 0,05$). Aucune différence du nombre de substances actives détectées dans les échantillons n'est également observée entre les mâles et les femelles ou entre les saisons (Wilcoxon - Mann et Whitney, $p > 0,05$). Nous ne pouvons cependant pas exclure que le faible nombre d'échantillons contenant des résidus d'AVKs (9/100) ne nous permette pas de disposer d'une puissance statistique suffisante pour étudier ces éventuelles différences.

Les concentrations totales sont présentées sur le graphique en

Figure 10 Le nombre d'échantillons pour lesquels au minimum une substance active AVKs a été détectée est représenté sur la carte en Figure 11. Du fait d'un nombre d'échantillons positifs très faible, il ne nous apparaît pas opportun de réaliser une analyse statistique spatiale des données tenant compte des caractéristiques paysagères des sites d'étude. Seule une discussion des résultats sera réalisée dans le paragraphe suivant.

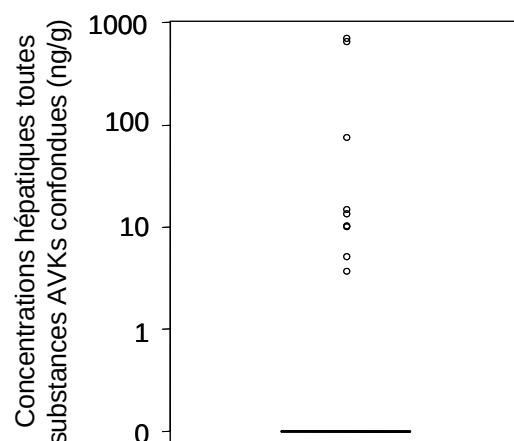


Figure 10. Concentrations mesurées dans les 100 échantillons de foie de rats noirs (boîte à moustache - échelle logarithmique). La médiane calculée sur les 100 échantillons est présentée par le trait horizontal.

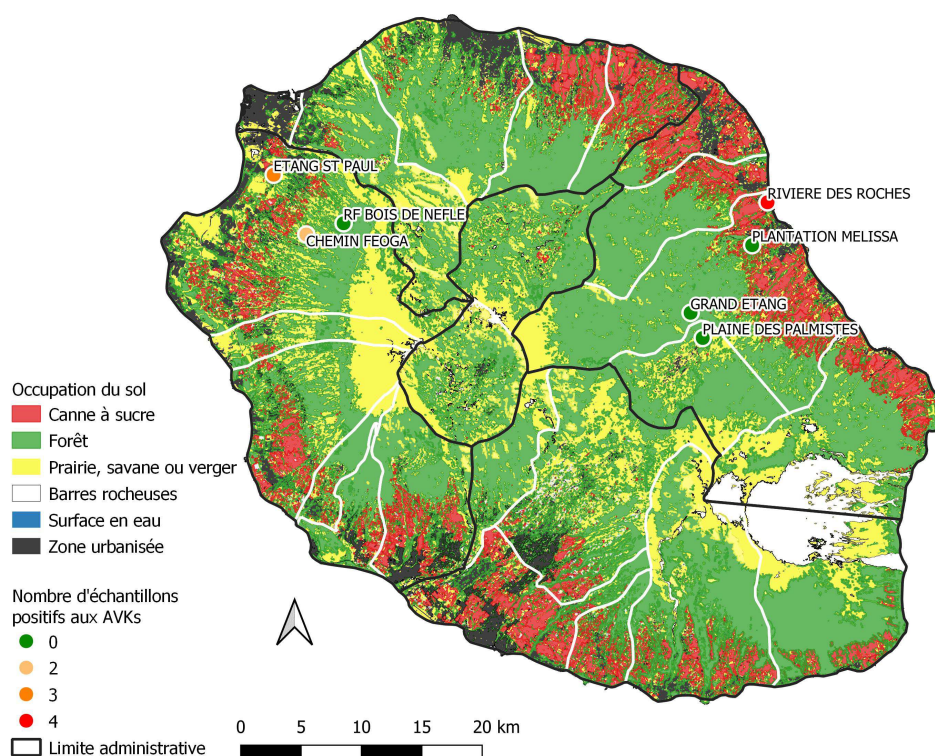


Figure 11. Localisation des sites sur lesquels les rats noirs ont été sélectionnés. La couleur de chaque site représente le nombre d'échantillons pour lesquels au moins une substance active AVKs a été détectée. Les limites communales sont présentées en blanc. Les limites en noir correspondent aux limites de zones arbitrairement définies entre nord, sud, est, ouest et centre de l'île. Le fond de carte représente l'occupation du sol à l'échelle de l'île (données CIRAD 2016).

4 DISCUSSION

4.1 Concentrations mesurées vs signes cliniques

Les concentrations hépatiques mesurées au cours de cette étude sont très faibles et ne semblent pas compatibles avec des doses létales pour des rats. Elles correspondent de ce fait pour la plupart à une exposition sublétales, ceci étant également le cas pour les 2 rats qui montrent des concentrations plus importantes (663 et 718 ng/g - comparaison avec des concentrations létales effectuée sur la base de données internes VetAgro Sup non publiées).

Nous pouvons également comparer les concentrations mesurées dans le cadre de cette étude à celles mesurées lors d'exposition contrôlée de rats bruns de laboratoire (*Rattus norvegicus* Wistar) par Fisher *et al.* (2003). Pour la substance active commune aux deux études, le brodifacoum, les concentrations moyennes suivantes ont été mesurées par Fisher *et al.* (2003) dans le foie après une exposition par intubation gastrique à la dose de 0,1 mg/kg : 1270 ± 90 ng/g une semaine après exposition ; 590 ± 50 ng/g 18 semaines après exposition et 490 ± 40 ng/g 24 semaines après exposition. Les concentrations maximales que nous observons dans le cadre de cette présente étude, toutes substances actives confondues (663 et 718 ng/g), sont donc comprises entre celles mesurées par Fisher *et al.* (2003) entre la 1^{ère} et la 18^{ème} semaine après une exposition à une dose de 0,1 mg/kg. Il en est de même pour l'individu présentant la concentration la plus forte en brodifacoum (642 ng/g). A noter que la DL₅₀ (dose létale pour 50% d'une population exposée) du brodifacoum chez le Rat brun a été évaluée à 0,27 mg/kg par Godfrey (1985). Une dose de 0,1 mg/kg telle que celle utilisée dans l'étude de Fisher *et al.* (2003) est donc 2,7 fois inférieure à cette DL₅₀. Cette dose à laquelle les rongeurs ont été exposés est donc très faible. Aucun signe clinique n'a d'ailleurs été rapporté sur les animaux utilisés lors de l'étude de Fisher *et al.* (2003).

Les concentrations maximales en brodifacoum mesurées dans la présente étude (ex. 642 ng/g) sont, par contre, proches des concentrations moyennes mesurées pour la même espèce en nature au cours d'un traitement (Spurr *et al.* 2005) (concentrations moyennes : 760 ng/g ; min : 0,0 ng/g ; max : 5650 ng/g). Le pourcentage de rats exposés était alors par contre très supérieur au cours de la phase de traitement dans l'étude de Spurr *et al.* (2005) (84%) par rapport à la présente étude (9%). Des concentrations maximales mesurées proches de 1000 ng/g tel que nous l'observons dans la présente étude étaient alors observées dans l'étude Spurr *et al.* (2005) entre 1 et 3 mois après le traitement.

Dans le cadre d'une étude plus récente réalisée en France (Jaquot 2013) sur deux zones de traitements biocides ou phytosanitaires, sur 15 Rats surmulots capturés, 5 (33%) contenaient des résidus d'au moins une substance active AVK rodenticide dont 4 à des concentrations inférieures à 100 ng/g et 1 à des concentrations comprises entre 100 et 1000 ng/g.

L'ensemble de ces informations nous laisse donc penser que la majorité des rats exposés de la présente étude sont très faiblement exposés comparé aux précédentes études (concentrations mesurées inférieures à 100 voir à 10 ng/g). Les concentrations mesurées sont proches de celles mesurées dans différentes conditions présentées précédemment. Tel que rapporté dans les précédentes études citées, les rats les plus exposés (ex. 600 à 700 ng/g) ne semblent pas montrer de concentrations compatibles avec une dose susceptible d'induire des effets létaux pour cette espèce.

4.2 Lien entre exposition et caractéristiques des sites d'étude

Du fait d'un trop faible nombre d'échantillons positifs (9 / 100), il ne nous paraît pas opportun de réaliser une analyse statistique spatiale des données. De plus, nous ne disposons pas d'informations précises sur la mise en œuvre d'éventuels traitements rodenticides sur les sites échantillonnés. Nous pouvons cependant observer que parmi les Rats noirs collectés et analysés sur les sites tels que RF Bois de Nefle, Grand Etang et Plaine des Palmistes, aucun n'est exposé aux rodenticides. Ces sites sont situés dans un environnement relativement peu anthropisé (hors zone urbanisée intense et zones de culture). Les sites qui comportent une proportion d'échantillon positifs la plus importante (Etang St Paul et Rivière des Roches) sont des sites situés en bas de bassin versant pour lesquels l'UMR PIMIT a mesuré un taux de prévalence de leptospires pathogènes chez les rats relativement élevé (Pablo Tortosa, com. pers.). Il se pourrait que des traitements rodenticides soient mis en œuvre sur ces sites de manière à mieux contrôler les populations de rongeurs. Malheureusement, il ne nous a pas été possible de vérifier cette hypothèse. Le site Chemin Feoga semble être une zone d'activité d'élevage bovins, porcins et volaille (Pablo Tortosa, com. pers.). Il se pourrait de ce fait que des traitements rodenticides plus importants soient également réalisés à proximité de ce site permettant d'interpréter 2 échantillons positifs retrouvés dans nos analyses. En ce sens, un traitement continu est recommandé par l'ARS, sur les zones d'élevages à proximité des abreuvoirs et des stabulations afin de limiter la prolifération des rats, au contact proche des troupeaux (Steve Augiron, Com. Pers.). Il est par contre surprenant qu'aucun échantillon positif n'ait été détecté sur le site Plantation Melissa situé en zone de plantation canne à sucre et à proximité de zones urbanisées où nous pourrions nous attendre également à des traitements rodenticides. Cependant, une étude en cours, mis en œuvre par la SEOR et appuyé par la Chambre d'Agriculture et la société Tereos, révèle par l'intermédiaire d'un sondage auprès des exploitants une forte variabilité dans les fréquences de traitement, allant de 0 à 24 passages annuels.

4.3 Implication pour l'exposition du Busard de Maillard

Nos résultats montrent qu'il peut exister une exposition sublétales du Rat noir aux rodenticides AVKs. La proportion de rats noirs exposés est cependant globalement faible (9% sur la totalité des échantillons). Aucune exposition n'a par ailleurs été détectée chez cette espèce dans 5 des 8 zones échantillonnées. Les concentrations mesurées dans le foie des animaux exposés restent également faibles.

Nos résultats montrent une exposition aux rodenticides possible pour les prédateurs de Rat noir, dont le Busard de Maillard. Au regard de cette étude, nous pouvons cependant supposer que cette exposition reste faible. Nous rappelons toutefois que cette étude n'est réalisée sur une seule espèce de rongeur susceptible de rentrer dans le régime alimentaire du busard et que celle-ci reste très néophobe (et donc probablement moins exposée aux appâts rodenticides que d'autres espèces, cf. discussion dans le paragraphe suivant). Aussi, les analyses ont été réalisées sur des individus collectés de manière opportuniste en exploitant des échantillons acquis dans le cadre d'un protocole de capture défini dans un objectif d'évaluer le risque de transfert de pathogènes à l'Homme. Un échantillonnage prévu spécifiquement dans l'objectif de mesurer l'exposition du Busard de Maillard aux rodenticides pourrait par la suite être intéressant à mettre en œuvre sur des sites de chasse, de reproduction ou de forts enjeux de conservation pour cette espèce.

4.4 Espèce étudiée et perspectives - espèces cibles / résistance

Les Rats noirs sont extrêmement néophobes et mangent difficilement les appâts raticides, même en l'absence de compétition alimentaire. Ceci pourrait expliquer le faible taux d'exposition mesuré dans le cadre de cette étude. En l'absence d'informations sur la mesure d'exposition du Rat noir lors d'autres échantillonnages ou encore d'autres espèces de rongeurs lors des mêmes échantillonnages, il nous est difficile de savoir si cette faible exposition est le reflet de la situation globale sur les sites échantillonnés quelque soit l'espèce de rongeurs ou si elle résulte du caractère néophobe de l'espèce prise en compte dans cette étude. De même, sur chaque site échantillonné, entre 7 et 18 animaux ont été analysés (total = 100). En cas de forte exposition de la population, ce nombre serait tout à fait suffisant. Dans notre cas, un nombre plus important d'analyse pourrait être opportun.

Nous pouvons cependant observer que, dans le cadre de l'étude réalisée à échelle spatiale fine présentée dans le chapitre précédent « Rongeurs - Axe 1 », une proportion plus importante de souris (5/16 soit 31% avant traitement et 18/21 soit 86% après traitement rodenticide de la parcelle) présentait des résidus de rodenticides détectables dans le foie. Il se pourrait que la souris soit donc plus largement exposée (31% avant traitement). Le faible effectif de rats noirs capturés dans le cadre de l'étude réalisée à échelle spatiale fine (n=2 dont un positif) ne nous permet cependant pas de comparer les résultats pour cette espèce entre les 2 approches.

Pour ces raisons, il aurait pu être opportun de sélectionner pour la présente étude une autre espèce moins néophobe (Rat brun ou Souris domestique par exemple). Il serait également intéressant de comparer l'exposition des 3 espèces (Rat noir, Rat brun et la Souris domestique) dans les mêmes sites et à la même période (printemps ou automne 2013). Un échantillonnage sur un nombre plus important de sites répartis préférentiellement sur les territoires de présence du Busard de Maillard serait également fortement recommandé. Ceci pourrait par exemple être mené tant au sein de domaines vitaux connus d'individus actuellement suivis (c.f. études en cours sur les suivis de déplacements, définition des territoires de chasse etc.), que sur les sites à fort enjeux de conservation ou un contrôle des populations de rongeurs est mis en place pour limiter l'impact de la prédation des rats sur des espèces d'oiseaux en danger (cas du l'Echenilleur de la Réunion et des Pétrels).

De même, une étude à large échelle spatiale sur la résistance de chacune des espèces cibles des traitements rodenticides serait intéressante dans l'objectif d'évaluer le lien éventuel entre efficacité et risque écotoxicologique des traitements rodenticides. Ceci sera présenté de manière plus approfondie dans les perspectives globales à la fin de ce rapport.

Busard de Maillard - Axe 1 : Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard retrouvés morts en nature ou accueillis affaiblis puis morts en centre de soin (mesures des résidus hépatiques).

- Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard retrouvés morts en nature ou accueillis affaiblis puis morts en centre de soin entre 1999 et 2016,
- Comparaison des concentrations mesurées dans le foie aux données de toxicité rapportées pour les rapaces dans la littérature internationale,
- Mise en relation de l'exposition ou de l'empoisonnement des busards avec différentes variables individuelles et environnementales.

Synthèse des principaux éléments :

- Parmi les 58 individus analysés, 54 (93%) avaient été exposés aux rodenticides et présentaient des résidus hépatiques d'au moins une substance active et 36 (62%) présentent une somme de résidus hépatiques toutes substances actives confondues > 100 ng/g, seuil reconnu par plusieurs auteurs comme potentiellement létal.
- Seulement 12% des individus étaient exposés à un seul AR, alors que 30%, 29%, 15% et 7% contenaient simultanément des résidus de 2, 3, 4 ou 5 substances actives, respectivement. La proportion d'animaux multi-exposés est particulièrement importante.
- Le difénacoum et la bromadiolone sont les substances actives les plus retrouvées (73 et 70% des individus analyses, respectivement). Elles ont été détectées ensemble le plus fréquemment (61% des individus analysés).
- La concentration médiane la plus haute a été mesurée pour la bromadiolone suivie par le difénacoum et le brodifacoum.
- Aucun échantillon n'a montré de résidus détectables de flocoumafen, de coumatène ou de coumatétralyl.
- Toutes substances actives confondues, le nombre de busards annuellement exposés a augmenté entre 1999 et 2016, alors que la proportion d'animaux annuellement exposés par rapport au nombre total d'animaux collectés ne montre pas de tendance interannuelle.
- Le nombre de busards exposés au brodifacoum a particulièrement et dramatiquement augmenté à partir de 2014, année qui semble correspond à la primo-utilisation de cette substance active en culture de canne à sucre.
- Les individus retrouvés dans les communes qui présentent des surfaces urbanisées ainsi que des surfaces de cultures de canne à sucre importante sont ceux qui présentent les concentrations en rodenticides AVKs les plus élevées.
- Les individus retrouvés dans les communes où les densités de couples nicheurs connus sont les plus fortes sont également ceux qui présentent des concentrations en rodenticides AVKs les plus élevées. Ceci rend malheureusement plus probable l'exposition des oiseaux vivant dans les zones de ressources les plus productives.
- Nos résultats suggèrent fortement que l'application de rodenticides AVKs en champs de canne à sucre et dans les zones urbanisées conduit à l'exposition et l'empoisonnement de busards. Ainsi, la mise en oeuvre rapide d'un plan intégré de contrôle des populations de rongeurs apparaît comme essentielle à la conservation du Busard de Maillard.
- Il apparaît indispensable que la distribution d'appâts contenant les substances actives les plus puissantes (ex. brodifacoum) soit proscrite en extérieur pour diminuer le risque d'empoisonnement du Busard de Maillard.
- Cette décision ne peut cependant pas être prise sans considérer le risque important de développement de souches de rongeurs résistants tel qu'identifié dans le chapitre précédent.
- **Ces différents points soulèvent la nécessité de réfléchir rapidement et de manière globale à un protocole intégré de contrôle des populations de rongeurs à l'échelle de l'île.**

1 OBJECTIFS ET CONTEXTE

1.1 Objectifs

Nous nous sommes ici intéressés à mesurer l'exposition aux rodenticides AVKs (ARs) de Busards de Maillard retrouvés morts en nature ou accueillis affaiblis puis morts en centre de soin. Les mesures de résidus ont été effectuées dans le foie de ces animaux collectés par la SEOR entre 1999 et 2016. L'interprétation des résultats a été réalisée selon les approches suivantes :

- Les concentrations hépatiques mesurées ont été comparées aux données de toxicité rapportées pour les rapaces dans la littérature internationale.
- Les concentrations hépatiques mesurées ont été confrontées aux facteurs susceptibles d'influencer l'exposition des busards tels que l'année de découverte de l'animal, son âge et son sexe, la composition paysagère présente à proximité du site de découverte ou encore la densité de couples nicheurs connus dans cette zone.

1.2 Contexte

Les animaux intégrés à cette étude ont été collectés par la SEOR entre 1999 et 2016. Ils ont été conservés entiers congelés, puis un prélèvement de foie a été réalisé avant envoi en analyse.

Les analyses toxicologiques ont été réalisées par Isabelle Fourel, USC 1233 Rongeurs sauvages – INRA VetAgro Sup Lyon.

Une analyse, interprétation et discussion des résultats a été réalisée puis publiée en 2019 par Michael Cœurdassier, Alexandre Villers, Steve Augiron, Mickaël Sage, François-Xavier Couzi, Virginie Lattard et Isabelle Fourel dans la revue *Biological conservation* (234, 37-44). Le titre de cette publication est le suivant : « *Pesticides threaten an endemic raptor in an overseas French territory* ». Son résumé est présenté ci-dessous. Ce chapitre reprendra la présentation en français des principaux éléments publiés dans l'étude.



Pesticides threaten an endemic raptor in an overseas French territory

Michael Coeurdassier^{a,*}, Alexandre Villers^{b,c}, Steve Augiron^d, Mickaël Sage^e,
François-Xavier Couzi^d, Virginie Lattard^f, Isabelle Fourel^f

^a Department Chrono-environnement, UMR UFC/CNRS 6249 aff. INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, 25030 Besançon, France

^b CEBC, UMR7372, CNRS-Université de la Rochelle, 79360 Beauvoir-sur-Niort, France

^c Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Unité Avifaune migratrice, Station de Chizé, 79360 Villiers-en-Bois, France

^d SEOR, 13 Ruelle des Orchidées, 97440 Saint-André, La Réunion, France

^e CD Eau Environnement, 25 Rue de la Grette, 25000 Besançon, France

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



ARTICLE INFO

Keywords:

Anticoagulant rodenticide

Circus maillardi

Mitigation

Poisoning

Réunion harrier

ABSTRACT

The Réunion harrier is an endangered raptor that is endemic to Réunion Island. Anticoagulant rodenticides (ARs) are widely applied on the island to prevent leptospirosis transmission to humans and limit the damage to sugarcane crops caused by rats and house mice. As these pesticides exhibit a high risk of secondary poisoning for rodent predators, we examined whether the Réunion harriers were exposed to and potentially poisoned by ARs. The AR concentrations in the livers of 58 harrier carcasses collected from 1999 to 2016 were measured. Both the temporal and spatial trends were analysed, and the influences of individual and landscape characteristics on the liver concentrations and potential poisoning were determined. AR residues were detected in 93% of the harriers. Difenacoum was the most frequently found (73% of positive cases), while brodifacoum and bromadiolone showed the highest concentrations. Both the numbers of harriers exposed to ARs and of individuals that were potentially poisoned increased over time. This is particularly alarming as the number of harriers potentially poisoned by brodifacoum increased dramatically beginning in 2014. We also showed that the landscape composition of the townships influenced the AR exposure, as the concentrations increased with the proportion of urban areas and showed a peak at 25% of the township under sugarcane cultivation. We conclude that AR poisoning is likely a main threat for Réunion harrier conservation and propose several actions to limit poisoning.

2 METHODOLOGIE

2.1 Collecte des échantillons

Cette étude a été réalisée sur 58 Busards de Maillard accueillis affaiblis puis morts au centre de soin de la SEOR ou retrouvés morts en nature entre 1999 et février 2016. Ces animaux ont été conservés à -18°C. Un prélèvement de foie a ensuite été réalisé en 2016 par la SEOR puis envoyé en analyse à l'USC 1233 Rongeurs sauvages – INRA VetAgro Sup Lyon.

Les informations telles que le sexe, l'âge, le lieu et la date de découverte ont été collectées lorsqu'elles étaient disponibles. Malheureusement, la localisation n'a pas pu être documentée pour 16 individus. Pour 17 autres, cette information était limitée au nom de la commune sur laquelle l'animal a été découvert. Les 25 individus restants bénéficiaient d'une localisation plus précise (lieu dit ou coordonnées géographiques). La date de collecte précise n'était également pas disponible pour 16 individus. Du fait de l'absence de nécropsie, aucun signe clinique habituellement observé lors d'empoisonnement aux rodenticides AVKs (ex. déficience de coagulation, traces hémorragies) n'a été décrit. La probabilité pour que l'animal soit mort des suites d'un empoisonnement aux rodenticides AVKs a, de ce fait, été déterminée uniquement à partir des concentrations en substances actives mesurées dans le foie en comparaison avec les données toxicologiques disponibles dans la littérature.

2.2 Analyses toxicologiques

La méthode analytique utilisée est décrite par Fourel *et al.* (2016) et utilise une chaîne analytique LC-MS/MS, méthode qui combine la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Cette méthode a été partiellement décrite dans le premier chapitre de ce rapport « Rongeurs - Axe 1 : Exposition des rongeurs cibles après un traitement rodenticide en canne à sucre – écotoxicologie et résistance ». Elle permet de doser simultanément les huit substances actives homologuées en Europe pour les produits rodenticides AVKs (le coumafène, le coumatétralyl, la chlorophacinone, la bromadiolone, le difénacoum, le flocoumafène, le brodifacoum et la diféthialone). Ce sont les substances actives les plus couramment utilisées dans le monde en tant que rodenticide. Une courbe de calibration a été réalisée et a permis la quantification des différents AVKs dans les échantillons. La LOQ (Limit Of Quantification) correspond au point le plus bas de la courbe de calibration, elle est ici comprise selon les substances actives entre 1 et 2 ng/g. La LOD (Limit Of Detection) a été définie comme la moitié de la LOQ soit entre 0,5 et 1 ng/g.

2.3 Analyses statistiques

Ont été considérés dans les différentes analyses :

- La concentration en rodenticide anticoagulant mesurée dans le foie des busards,
- Le nombre de busards exposés (foie contenant au minimum un rodenticide anticoagulant),
- La proportion de busards exposés (nombre d'individus exposés / nombre total d'individus analysés) par année ou par commune,
- La proportion de busards pour lesquels un empoisonnement aux rodenticides anticoagulants est suspectée comme étant la principale cause de mortalité (nombre d'individus suspectés empoisonnés / nombre total d'individus analysés) par année ou par commune.

2.3.1 Comparaisons des concentrations mesurées aux données toxicologiques connues

Newton *et al.* (1999) et Thomas *et al.* (2011) ont montré pour des rapaces que des concentrations totales en rodenticides AVKs dans le foie > 100 ng/g étaient compatibles avec un empoisonnement létal. Les concentrations mesurées dans la présente étude ont été exprimées en tant que variable binomiale (0-1) et comparées à cette concentration définie comme susceptible d'être létale : peu probable (0 si < 100 ng/g) et potentielle (1 si > 100 ng/g). Cette analyse a été effectuée indépendamment pour chaque substance active. De manière à considérer un effet cumulatif des substances actives, cette analyse a également été réalisée en prenant en compte la somme des concentrations mesurées, toutes substances actives confondues, pour un même animal.

En premier, l'ordination des différentes concentrations en rodenticides mesurées pour chaque individu a été explorée en Analyse en Composantes Principales (ACP). Ensuite, nous avons cherché si ces concentrations pouvaient être expliquées par le sexe ou l'âge des individus par une analyse de variance inter classe (Dray *et al.*, 2018). L'influence de ces paramètres (âge et sexe) sur la proportion de busards présentant des résidus de rodenticides ou sur la proportion d'animaux empoisonnés a été analysée en utilisant des modèles généraux linéaires binomiaux (GLM).

2.3.2 Tendances temporelles

L'évolution temporelle des concentrations hépatiques mesurées entre 1999 et 2016 (transformation logarithmique) de chaque substance active a été analysée par modèle général additif à effet mixte (GAMM) (Wood, 2017) avec un effet aléatoire par individu.

La tendance temporelle pour le nombre ou la proportion d'individus exposés par année ou par mois a été analysée avec la probabilité adaptée (Poisson pour le nombre et binomial pour la proportion).

Pour tous les cas, un effet de lissage (smooth effect) a été utilisé pour chaque année comme variable explicative pour chaque substance active avec un nombre de degrés de liberté limité à 5. Pour ce qui est du nombre de busards exposés ou empoisonnés par an, les tendances interannuelles ont été vérifiées de 1999 à 2015, l'enquête n'ayant été menée que sur 2 mois en janvier et février 2016.

2.3.3 Tendances spatiales

Nous avons vérifié si les busards collectés, les busards exposés ou ceux ayant des concentrations supérieures à 100 ng/g étaient distribués régulièrement, au hasard ou regroupés dans l'espace selon le test d'agrégation de Clark-Evans (Clark et Evans, 1954). Ensuite, nous avons vérifié si la composition du paysage influençait les niveaux d'exposition aux rodenticides AVKs. Étant donné le faible nombre d'oiseaux connus avec un lieu précis de découverte (n=22), les analyses ont été effectuées au niveau des communes (n=42). Pour chaque commune, nous avons calculé la proportion de canne à sucre et de zones urbaines. Les données ont été extraites d'une carte de classification (Source : CIRAD, 2018) qui a été pixellisée sur une grille de 5 x 25 pixels, puis agrégée à une résolution de 250 mètres. En outre, nous avons vérifié si une exposition plus forte était liée à la distribution spatiale des couples connus de busards reproducteurs afin de mieux cibler les efforts de conservation. Nous avons supposé que cette distribution était relativement stable au cours de la période d'étude. Cette comparaison a reposé sur les données d'une enquête réalisée à grande échelle pour évaluer la taille de la population et la répartition des couples territoriaux (données SEOR non publiées). L'enquête a été fondée sur 184 points d'observations espacés chacun d'environ 2 000 m et échantillonnés en 2017 au cours de la saison de reproduction (de mai à juin). Le dénombrement n'a été effectué que dans des conditions météorologiques acceptables, c'est-à-dire pas ou très peu de vent ou de pluie. Nous avons appliqué un lissage spatial (package spatstat ; fonction ppp.smooth(), $\sigma=5000$ m) aux données de comptage brutes de couples de busards territoriaux (Baddeley *et al.*, 2016). Cela a permis de produire une carte lissée permettant de représenter la densité de couples territoriaux, reflétant ainsi leur répartition sur l'île. Cette information sera nommée densité de busards dans la suite du document. La densité moyenne a ensuite été calculée pour chaque commune.

2.3.4 Lien éventuel entre exposition des busards, composition paysagère et densités de couples reproducteurs

Nous avons ensuite cherché à modéliser les concentrations en rodenticides AVKs ainsi que la proportion d'individus exposés / empoisonnés en tant que variable réponse en fonction de différentes variables explicatives en utilisant des modèles de type modèles additifs généralisés à effet mixte (generalized additive mixed model GAMM). Pour chacun des modèles, un individu correspondait à une unité d'échantillonnage. Nous avons comparé 18 modèles par variable de réponse (incluant le modèle Null), avec le modèle complet incluant un terme lissé (smooth) pour l'année, la proportion de culture de canne à sucre ainsi que la proportion en surface urbanisée sur la commune (ou l'interaction des deux). La commune a

été incluse comme facteur aléatoire. Ensuite, les modèles GAMMs avec des variables réponse semblables ont été testés pour chaque substance active séparément. Compte tenu de la taille relativement limitée de l'échantillon ($n=42$), nous avons limité à $k=5$ le nombre maximal de degrés de liberté des termes lissés (smooth) afin d'éviter les modèles aberrants. Les modèles ont été classés en fonction de leurs notes AIC (Critère d'Information d'Akaike).

Toutes les statistiques ont été effectuées avec R.3.3 (R Core Team, 2018) et les bibliothèques *ade4* (Dray *et al.*, 2018), *gamm4* (Wood et Scheipl, 2017), *geoR* (Ribeiro et Diggle, 2016), *lme4* (Bates *et al.*, 2015), *mgcv* (Wood, 2017), *spatstat* (Baddeley *et al.*, 2016) et *multcomp* (Hothorn *et al.*, 2008).

3 RESULTAT

Parmi les 58 busards analysés, 23 étaient des femelles, 31 des mâles. Pour 4 individus, le sexe n'était pas reporté. Les adultes représentaient 71% des individus. A la fois le sexe ratio et la structure d'âge sont restés stables au cours du temps (GLM binomial, $p > 0,26$). Le nombre de carcasses collectées chaque année est présenté dans la FIGURE 12a pour le nombre total d'individus ainsi que pour le nombre d'individus exposés au minimum à une substance active. La FIGURE 12b présente les mêmes informations isolées cette fois ci pour une substance active caractéristique : le brodifacoum.

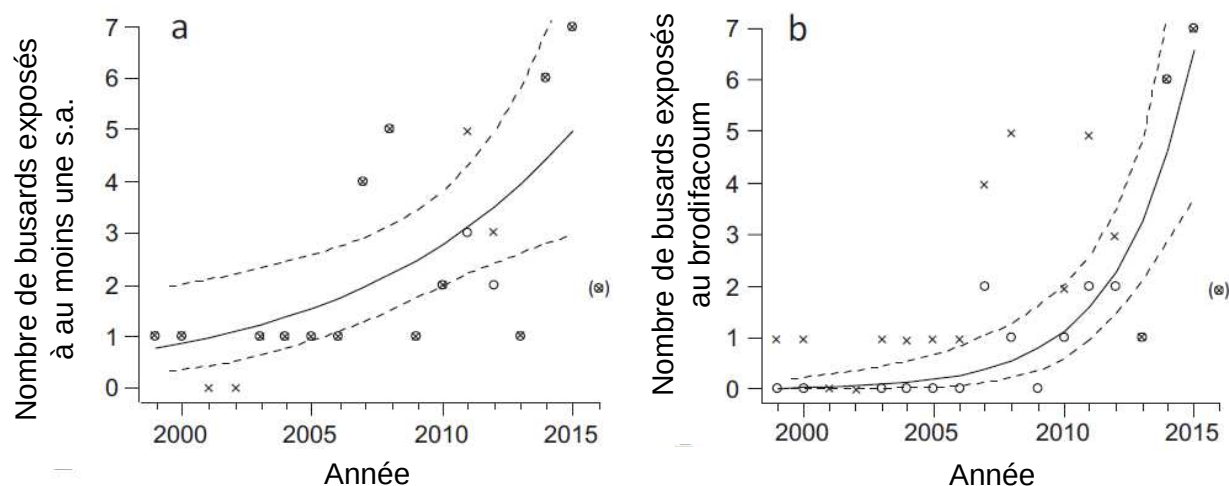


Figure 12. Variations interannuelles du nombre de Busards de Maillard positifs pour a) au moins un rodenticide anticoagulant et b) au brodifacoum seul. Le nombre total de carcasses récoltées chaque année est représenté par des x. Les tendances ont été estimées avec un GAM (sans tenir compte d'aucune autre variable) sans les données de 2016 (seulement 2 mois suivis cette année-là). Les données pour 2016 sont représentées entre parenthèses. Les lignes en pointillés représentent les intervalles de confiance de 95 % des estimations.

3.1 Proportion et nombre de Busards de Maillard exposés aux ARs

Quatre-vingt-treize pourcent des individus analysés (54/58) étaient exposés aux rodenticides AVKs. Les proportions d'individus exposés pour chaque substance active détectée sont présentées dans le TABLEAU 7. Aucun échantillon n'a montré de résidus détectables de flocoumafen, de coumafène ou de coumatétralyl. Seulement 12% des individus étaient exposés à un seul AR, alors que 30%, 29%, 15% et 7% contenaient simultanément des résidus de 2, 3, 4 ou 5 substances actives, respectivement. La bromadiolone et le difénacoum ont été détectés ensemble le plus fréquemment (61% des individus analysés).

Tableau 7. Pourcentage d'individus exposés en fonction de la substance active AVK.

Substance active AVK	Pourcentage d'individus exposés
Difénacoum	73%
Bromadiolone	70%
Brodifacoum	51%
Chlorophacinone	41%
Diféthialone	18%
Flocoumafen	0%
Coumafène	0%
Coumatétralyl	0%

3.1.1 Influence du sexe et de l'âge des individus

Le nombre d'ARs détectés par individu n'est pas dépendant du sexe ou de l'âge (GLM Poisson, $p > 0,24$) et aucune tendance temporelle n'a été montrée (GLM Poisson, $p > 0,15$). La proportion de busards exposés n'est également pas dépendante du sexe et de l'âge de l'individu en groupant toutes les substances actives (GLM binomial, $p > 0,81$) ou en considérant chaque substance active séparément (GLM binomial suivant la substance active ; $0,077 < p < 0,86$).

3.1.2 Tendances temporelles

Toutes substances actives confondues, le nombre de busards exposés par an a augmenté entre 1999 et 2016 (GAM Poisson, $\text{edf}=1$; $p < 0,01$, Figure 12), alors que la proportion d'animaux exposés par an ne montre pas de tendance interannuelle (GAM binomial, $\text{edf}=1,81$; $p=0,90$).

Lorsque chaque substance active est analysée indépendamment, aucune tendance temporelle n'a été mise en évidence à l'exception des deux points suivants : la proportion d'individus exposés au difénacoum montre une diminution linéaire négative ($\text{edf}=1$, $p < 0,05$) et la proportion d'individus exposés à la chlorophacinone montre une évolution temporelle non linéaire ($\text{edf}=3,4$; $p < 0,01$) avec un pic observé en 2008.

Aucune tendance intra-annuelle pour le mois de découverte de l'animal n'a été montrée pour le nombre (GAM Poisson, $\text{edf}=2,85$, $p=0,2$) ou la proportion d'individus exposés (GAM binomial, $\text{edf}=2,1$; $p=0,4$). Lorsque chaque substance active est analysée indépendamment, aucune tendance temporelle n'a été mise en évidence à l'exception du nombre de busards exposés au brodifacoum qui montre un pic en juillet (GAM Poisson, $\text{edf}=3$; $p < 0,05$).

3.1.3 Variations spatiales

Les busards exposés aux ARs sont spatialement agrégés (test de Clark-Evans, $R=0,59$; $p=0,001$). Parmi les 42 individus pour lesquels la commune du lieu de découverte a été rapportée, 93% ($n=39$) montrent des résidus d'ARs détectables et une proportion non négligeable (40%) a été découverte à l'est de l'île. Seuls 2 individus ont été découverts au centre de l'île et ils ne présentent pas de résidus d'ARs.

Lorsque chaque substance active est analysée indépendamment, une agrégation spatiale est montrée pour la bromadiolone, le difénacoum et le brodifacoum (test Clark-Evans, $R=0,59$; $p=0,001$; $R=0,050$; $p=0,001$ et $R=0,43$; $p=0,001$, respectivement) avec des répartitions spatiales similaires à celles décrites précédemment pour toutes substances actives confondues.

3.2 Concentrations mesurées dans le foie

La concentration médiane la plus haute a été mesurée pour la bromadiolone suivie par le difénacoum et le brodifacoum (FIGURE 13). Les résidus de diféthialone sont les plus faibles mesurés pour les SGARs (FIGURE 13).

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) révèle une association positive pour de mêmes individus entre les concentrations en diféthialone et en difénacoum. Les concentrations en bromadiolone et en chlorophacinone semblent faiblement liées entre elles et tendent à montrer une corrélation négative avec les concentrations en brodifacoum.

Aucun lien n'a été montré entre les concentrations mesurées dans le foie et l'âge ou le sexe des individus (ratio analyse de variance inter classe =0,019 et 0,012 ; test de permutation, $p=0,38$ et 0,69, respectivement).

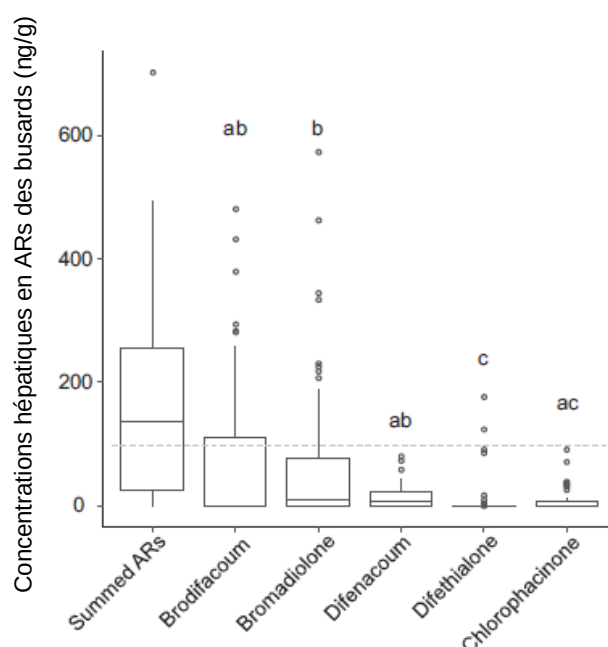


Figure 13. Concentrations en rodenticides AVKs (ARs) mesurées dans les foies des Busards de Maillards collectés entre 1999 et 2016 ($n=58$). Des lettres différentes indiquent des différences significatives de concentrations entre les substances actives. La ligne horizontale en pointillés à 100 ng/g représente le seuil au-dessus duquel l'empoisonnement est considéré potentiel selon Newton et al. (1999) et Thomas et al. (2011).

3.2.1 Tendances temporelles

Entre 1999 et 2016, plusieurs tendances temporelles ont été démontrées pour les concentrations mesurées en brodifacoum, bromadiolone, chlorophacinone et difénacoum. Les concentrations en brodifacoum ont augmenté brusquement depuis 2012 (GAMM, $\text{edf}=2,47$; $p < 0,0001$). Celles en bromadiolone montrent un pic en 2003 (GAMM, $\text{edf}=3,59$; $p < 0,001$) (FIGURE 14). Un faible pic a également été montré pour la chlorophacinone de 2007 à 2008 (GAMM, $\text{edf}=3,77$; $p < 0,001$) alors que les concentrations en difénacoum diminuent progressivement dès les premières données observées en 1999 (GAMM, $\text{edf}=1$; $p < 0,05$) (FIGURE 14).

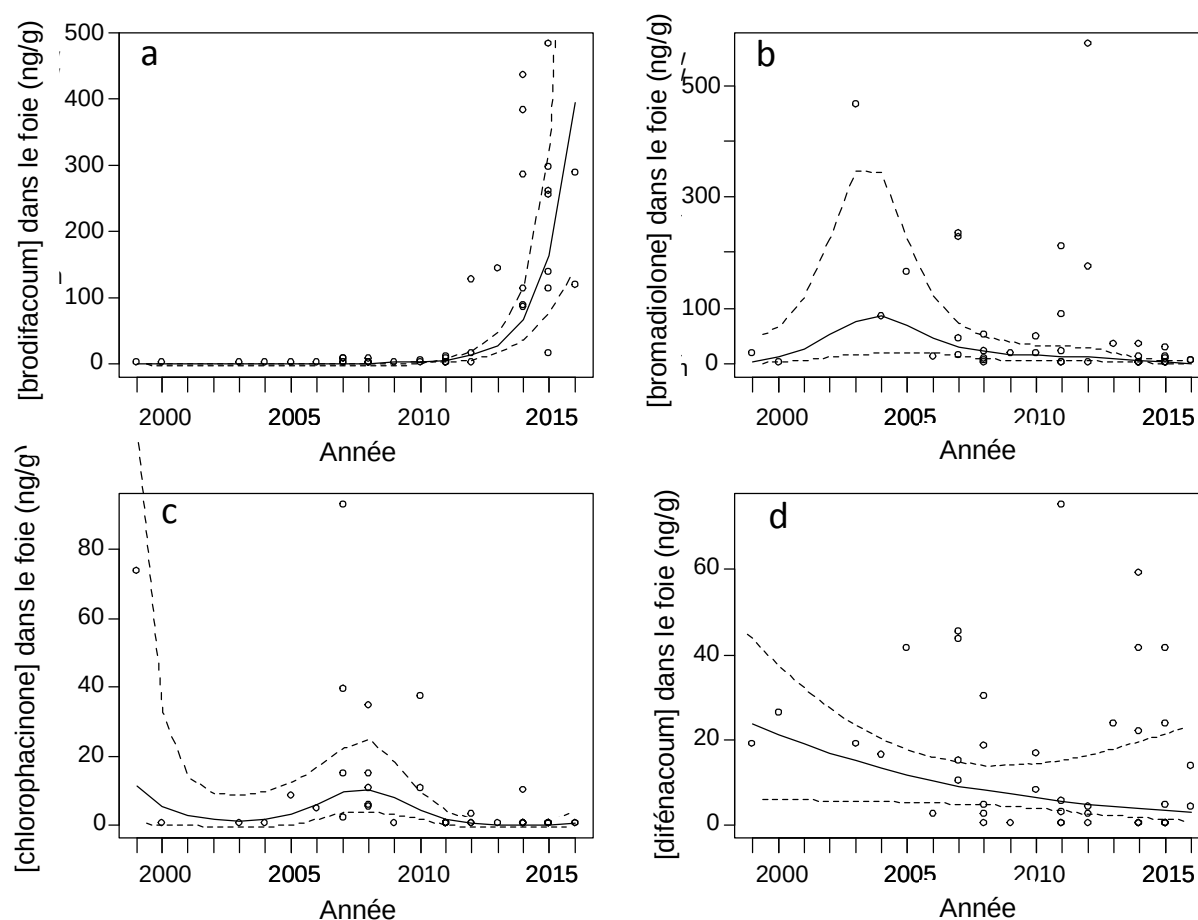


Figure 14. Variations interannuelles des concentrations hépatiques du Busard de Maillard pour le brodifacoum a), le bromadiolone b), le chlorophacinone c) et le difénacoum d). Les tendances ont été estimées par GAM (sans tenir compte d'aucune autre variable). Les lignes en pointillés représentent les intervalles de confiance de 95 % des estimations.

3.2.2 Variations spatiales

Les concentrations mesurées dans le foie de chacun des individus dont le lieu de découverte était documenté ($n = 42$) sont représentées sur la FIGURE 15 pour toutes substances actives confondues. Ces concentrations seront confrontées à la composition paysagère à proximité du site de découverte dans un paragraphe suivant.

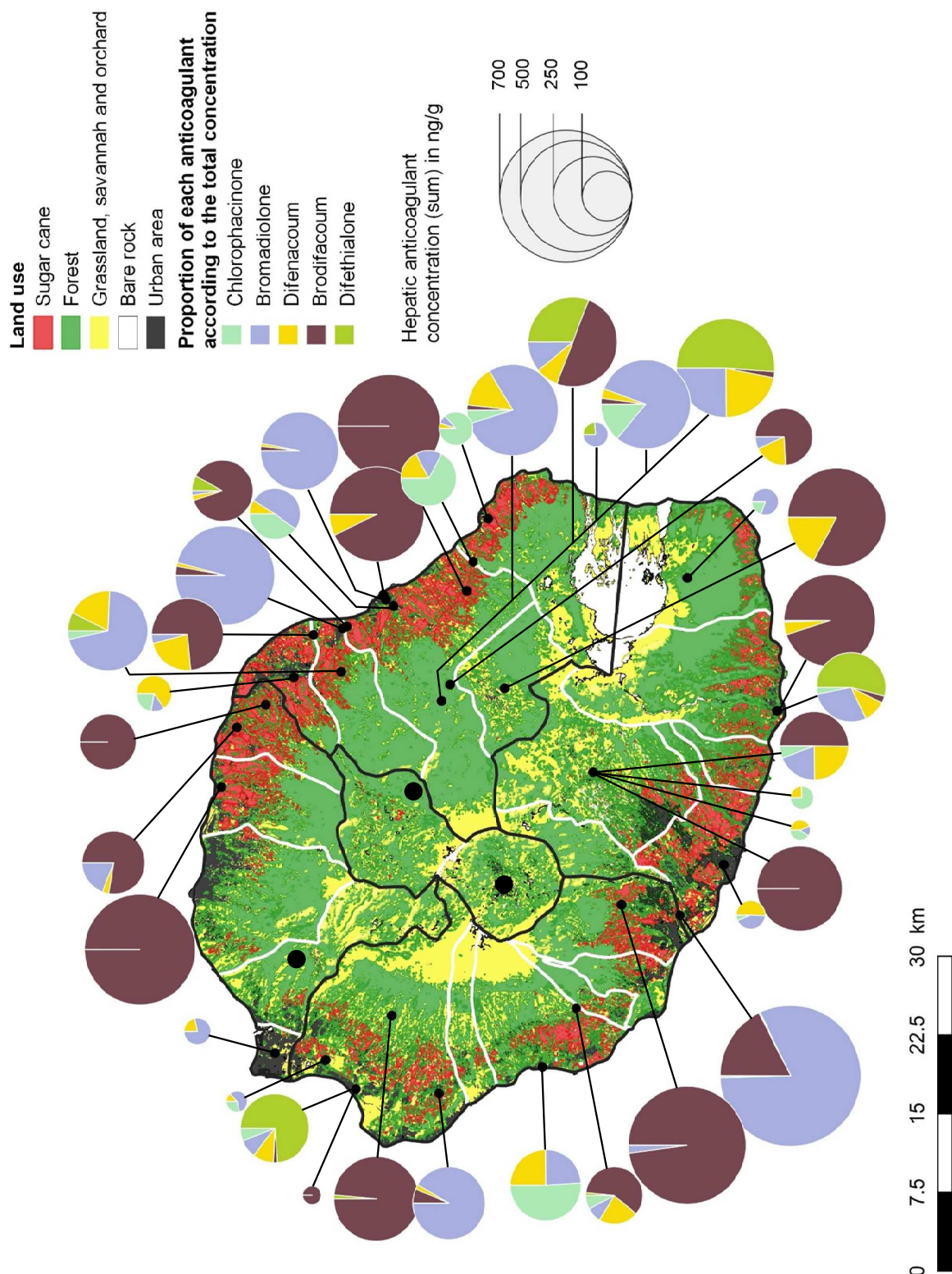


Figure 15. Carte de l'île de la Réunion présentant le lieu de découverte, la somme des concentrations en rodenticides AVKS ainsi que la proportion de chaque substance active mesurée dans le foie des Busards de Maillards collectés entre 1999 et 2016 dont la localisation était documentée ($n = 42$). Les limites des communes sont présentées en blanc et les zones sud, est, nord, ouest et du centre de l'île sont limitées en noir. Les grands points noirs sans diagramme représentent les individus pour lesquels aucun résidu n'a été détecté ($<LOD$; $n = 3/42$). Lorsque l'emplacement exact de la découverte n'a pas été signalé, la carcasse busard a été localisée sur le centroïde de la commune de découverte.

3.3 Cas potentiels d'empoisonnement (concentrations > 100 ng/g)

Trente-six busards (62%) présentent une somme de résidus hépatiques toutes substances actives confondues > 100 ng/g. Les concentrations en brodifacoum, en bromadiolone et en diféthialone mesurées seules sont supérieures à cette valeur seuil pour 16, 11 et 2 individus, respectivement. Pour 2 de ces individus, les concentrations en bromadiolone et en brodifacoum sont toutes deux > 100 ng/g, alors que pour 9 individus, seule la somme de toutes les substances actives détectées est > 100 ng/g. Ainsi, pour la suite des analyses, seules les concentrations totales en ARs ainsi que les concentrations en brodifacoum et en bromadiolone seront retenues.

3.3.1 Tendances temporelles

Le nombre d'empoisonnements potentiels tend à augmenter entre 1999 et 2015 (Poisson GAM, edf=1,5 ; $p=0,002$; [FIGURE 16](#)). La proportion d'empoisonnement potentiels tend également à augmenter entre 2008 et 2015 (GAM binomial, edf=2,1 ; $p=0,054$) alors que la tendance à la diminution observée entre 1999 et 2007 montre une large variabilité et doit, de ce fait, être considérée avec précaution.

L'augmentation constatée au cours des trois dernières années est particulièrement alarmante puisque 56 % des individus montrant des concentrations hépatiques supérieures à 100 ng/g ont été collectés entre 2013 et 2016.

En 2013 et en 2016, tous les individus collectés étaient potentiellement empoisonnés par le brodifacoum ([Figure 16](#)). Lorsque seuls sont pris en compte les empoisonnement potentiels au brodifacoum, à la fois le nombre de cas ainsi que leur proportion annuelle ont augmentés au cours du temps (GAM Poisson, edf=1 ; $p < 0,001$; GAM binomial, edf=1 ; $p < 0,01$, respectivement, [FIGURE 16](#)). Pour la bromadiolone, aucune tendance temporelle n'a été détectée que ce soit pour le nombre (GAM Poisson, edf=1,4 ; $p=0,74$) ou la proportion d'empoisonnements annuels (GAM binomial, edf=3,74 ; $p=0,28$).

Des variations intra-annuelles ont également été observées pour le nombre et la proportion d'individus potentiellement empoisonnés chaque mois. Dans les deux cas, une tendance non linéaire est observée, avec un pic d'empoisonnements potentiels en juillet (GAM Poisson, edf=2,9 ; $p < 0,01$ et GAM binomial, edf=2,7 ; $p < 0,05$, respectivement). Toutefois, pour le brodifacoum et la bromadiolone, aucune différence du nombre (GAM Poisson, edf=2,8 ; $p=0,22$ et edf=1,8 ; $p=0,33$, respectivement) ou de la proportion (GAM binomial, edf=1 ; $p=0,69$ et edf=1 ; $p=0,20$, respectivement) de cas d'empoisonnements potentiels n'a été détectée entre chaque mois.

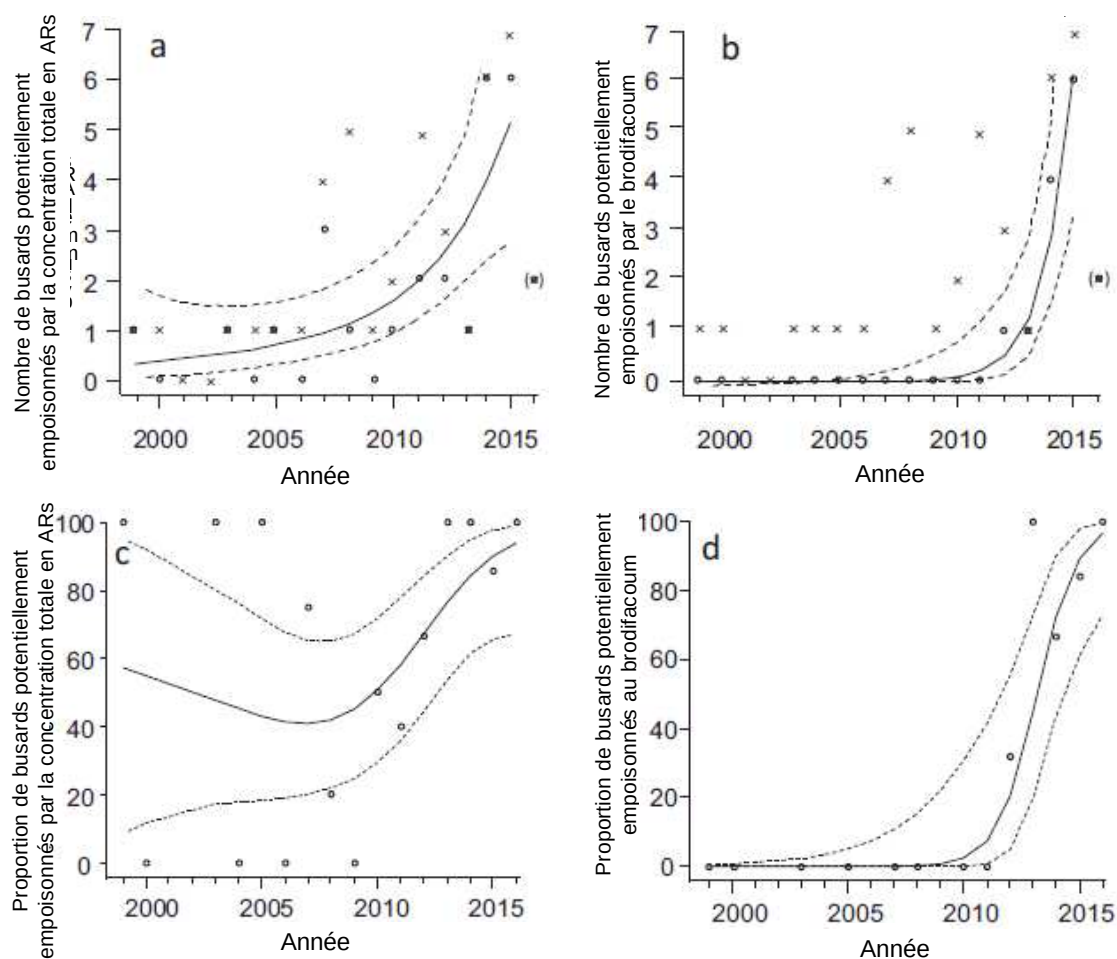


Figure 16. Variations interannuelles du nombre de Busards de Maillard potentiellement empoisonnés par la quantité totale de rodenticides AVKs a) ou par le brodifacoum seulement b) et proportion de busards potentiellement empoisonnés par quantité totale de rodenticides AVKs c) ou par le brodifacoum d) calculée à partir du nombre total de carcasses collectées au cours d'une année. Le nombre total de carcasses collectées par an est représenté par x a) et b). Les tendances ont été estimées à l'aide d'un GAM (sans tenir compte d'aucune autre variable) sans les données de 2016 pour a et b (seulement 2 mois suivis cette année-là). Les données pour 2016 sont représentées entre parenthèses. L'empoisonnement potentiel est pris en compte lorsque les concentrations hépatiques (additionnées ou pour chaque substance active séparément) sont >100 ng/g. Les lignes en pointillés représentent les intervalles de confiance de 95 % des estimations ; $n=15$ pour le nombre et $n=42$ pour les proportions.

3.3.2 Variations spatiales

Si l'on considère les concentrations hépatiques totales mesurées toutes substances actives confondues, les busards potentiellement empoisonnés étaient agrégés spatialement (test Clark-Evans, $R=0,50$, $p=0,001$), avec 14 cas dans l'est de l'île, 6 dans le sud, 5 dans l'ouest et 3 dans le nord. Aucun regroupement spatial n'a cependant été détecté pour les busards potentiellement empoisonnés uniquement par le brodifacoum ou la bromadiolone (test de Clark-Evans, $R=0,88$; $p=0,083$; $R=0,86$; $p=0,10$, respectivement). Nous nous interrogerons dans le paragraphe suivant sur les causes biologiques susceptibles d'expliquer ces répartitions spatiales non homogènes.

3.4 *Lien éventuel entre exposition des busards, composition paysagère et densité de couples reproducteurs.*

Le meilleur modèle sélectionné pour exprimer au mieux les variations de la somme des concentrations hépatiques toutes substances actives confondues incluait un lissage (effet smooth) pour les variables suivantes : l'année, la densité de couples reproducteurs connus ainsi que la proportion de culture de canne à sucre et de surface urbanisée dans la commune dans laquelle l'individu a été découvert.

Les concentrations totales en ARs augmentent linéairement avec la densité de couples reproducteurs connus dans la commune (GAMM, edf=1 ; $p < 0,01$, FIGURE 17). L'influence du paysage varie, par contre, selon le type d'habitat. Une augmentation non linéaire de l'exposition est observée entre concentrations mesurées en ARs et proportion de zones urbanisée dans la commune (GAMM, edf=1,48 ; $p < 0,01$). Les concentrations totales mesurées dans le foie des busards sont maximales lorsque 25 % de la superficie de la commune est couverte par de la culture de canne à sucre (GAMM, edf=2,3 ; $p < 0,01$) (FIGURE 17).

Les mêmes analyses répétées sur chaque substance active analysée séparément montrent une relation marginale entre les concentrations de brodifacoum et la densité de couples reproducteurs ou la surface de canne à sucre (GAMM, augmentation linéaire, edf=1 ; $p=0,086$ et tendance non linéaire avec un pic à 30% de surface de canne à sucre, edf=2,43 ; $p=0,088$, respectivement). Enfin, la proportion de busards potentiellement empoisonnés par le brodifacoum augmente linéairement mais de manière faible avec les surfaces de culture de canne à sucre dans la commune (GAMM, edf=1 ; $p=0,076$).

4 DISCUSSION

4.1 *Exposition du Busard de Maillard aux rodenticides en comparaison aux données connues pour les rapaces continentaux*

Cette étude est à notre connaissance la première à s'intéresser à l'exposition aux rodenticides du Busard de Maillard et plus généralement de la faune sauvage sur l'île de la Réunion. La proportion de busards exposés est très élevée, puisque 93 % des oiseaux analysés montrent des résidus de rodenticides dans leurs foies. Les concentrations mesurées sont compatibles avec l'empoisonnement pour 62% d'entre eux.

4.1.1 Une collecte des animaux affaiblis ou des cadavres opportunistes

Comme dans la plupart des programmes mis en oeuvre à grande échelle pour la surveillance de l'empoisonnement de la faune (par exemple, réseau SAGIR en France métropolitaine, WIIS au Royaume-Uni), l'échantillonnage de la présente étude repose sur la découverte opportuniste d'individus morts ou affaiblis sans aucune évaluation de l'effort d'échantillonnage dans l'espace et dans le temps. La probabilité de découverte de carcasses peut être liée à la densité de la population humaine et aux habitudes d'activité, à la sensibilisation des gens à la conservation de la faune et/ou à leur investissement pour rechercher et recueillir des oiseaux morts ou affaiblis. Par conséquent, les tendances que nous avons documentées, notamment celles qui ont trait au nombre de busards exposés ou potentiellement empoisonnés, peuvent représenter une image biaisée de l'exposition réelle de la population globale.

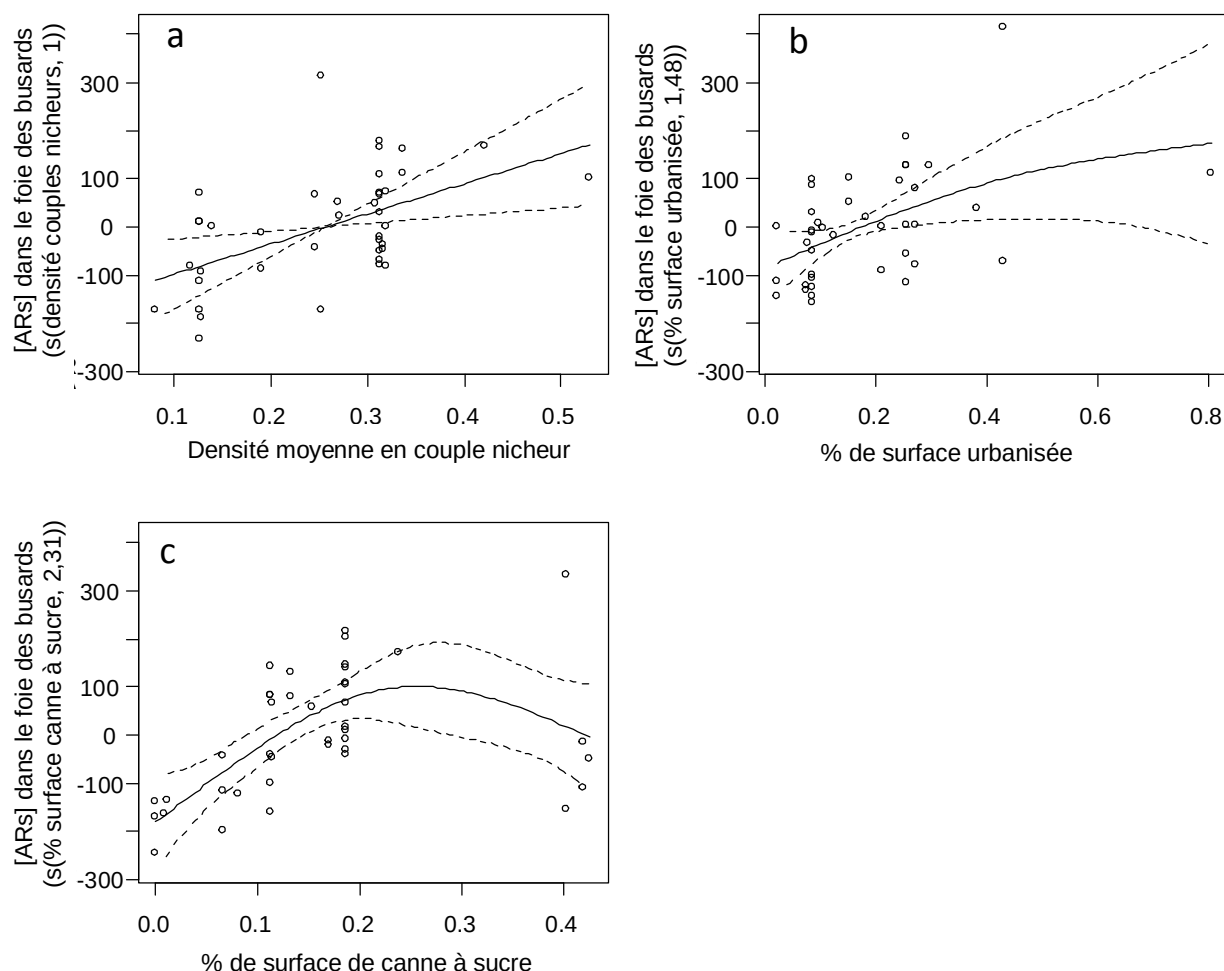


Figure 17. Relation entre les sommes des concentrations de rodenticides AVKs mesurées dans les Busards de Maillard et la densité estimée des couples reproducteurs de busard a), la proportion de zones urbanisée b) et la proportion de zones de culture de canne à sucre c) au niveau des communes. Les tendances ont été estimées par un GAMM. L'axe Y représente le terme lissé (effet smooth), s, généré par le GAM et est estimé sous réserve de la contrainte que $\sum s(x_i) = 0$, où x_i sont les valeurs des covariables. Chaque covariable ainsi que les degrés estimés de liberté, edf, sont indiqués entre parenthèses. Le terme lissé, s, est centré sur l'identification du modèle. Les lignes en pointillés représentent les intervalles de confiance de 95 % des estimations; $n=40$.

4.1.2 Malgré cela, une exposition aux rodenticides AVKs sans équivoque

Cependant, que ce soit le nombre ou la proportion d'oiseaux exposés, ou encore les fortes concentrations mesurées particulièrement au cours des dernières années du suivi, toutes les informations collectées montrent sans équivoque que l'exposition du busard aux anticoagulants rodenticides représente une menace pour cette espèce. Bien que le taux d'exposition observé dans la présente étude soit l'un des plus élevés signalés, il est conforme aux taux précédemment observés pour d'autres rapaces, c'est-à-dire 58 % en moyenne avec des pics supérieurs à 90 % (López-Perea et Mateo, 2018).

4.1.3 Une proportion d'animaux multi-exposés très importante

Tel que rapporté habituellement pour les rapaces et la faune sauvage en général, nous avons observé que les substances actives de seconde génération (SGARs) étaient celles les plus présentes dans le foie des Busards de Maillard analysé. Ceci s'explique notamment par leur plus grande persistance dans les tissus que les substances de première génération (FGARs). Si les multi-expositions (exposition d'un même individu à plusieurs substances actives) ont souvent été observées dans d'autres études, la proportion mesurée dans notre étude (81%), est l'une des plus élevées observée à ce jour (Christensen *et al.*, 2012). Il est de ce fait légitime de s'interroger sur les facteurs à l'origine de l'exposition aux rodenticides AVKs du Busard de Maillard. Ces interrogations seront discutées ci-après.

4.2 *Composition paysagère et exposition du busard aux rodenticides AVKs*

Deux usages réglementaires des rodenticides se distinguent en Europe : Les biocides sont utilisés pour le contrôle des rongeurs commensaux dans un objectif par exemple de protection de la santé humaine ou des denrées alimentaires et des installations. Les produits phytopharmaceutiques (PPP) sont utilisés pour lutter contre les ravageurs agricoles dans un objectif de protection des cultures (Jacob et Buckle, 2018). Sur l'île de la Réunion, les rodenticides sont utilisés à l'intérieur et autour des bâtiments, mais sont également appliqués dans les cultures pour contrôler les populations de rats et de souris, tant pour prévenir la leptospirose que pour limiter les impacts aux cultures (Grollier et Soufflet, 2011). Ils sont également utilisés en quantités moindres pour la conservation de certaines espèces d'oiseaux en danger (contrôle des populations de rongeurs responsables de prédateurs sur les œufs ou les jeunes au nid de Pétrels ou de Tuit Tuit). Nos résultats montrent un effet évident de la composition paysagère avec une exposition plus forte aux rodenticides AVKs notamment dans les zones urbanisées et les cultures de canne à sucre.

Hindmarch et Elliot (2018) ont examiné la façon dont le paysage module l'exposition des prédateurs aux rodenticides. Ils ont montré que les habitats fortement influencés par les activités humaines, comme l'agriculture intensive ou l'urbanisation, sont des paysages à risque, notamment du fait qu'ils sont susceptibles d'accueillir une forte densité de rongeurs et d'être traités de façon intensive et permanente avec des rodenticides.

Dans l'ensemble, 75 % des couples reproducteurs de busards nichent à l'interface entre les zones de canne à sucre et les habitats semi-naturels (Bretagnolle *et al.*, 2000a,b). Ils chassent cependant également dans des habitats urbains, comme les terres en jachère ou les friches, et peuvent donc se nourrir de rongeurs contaminés sur une partie importante de leur domaine vital.

4.2.1 Proximité avec les zones urbanisées

Nous avons constaté que les concentrations en rodenticides AVKs mesurées dans le foie des Busards de Maillard étaient relativement élevées pour les animaux qui étaient découverts dans des communes qui montrent d'importantes surfaces urbanisées. Ceci est conforme aux conclusions de Hindmarch et Elliot (2018) habituellement observées pour l'exposition des prédateurs aux rodenticides. Ces observations suggèrent fortement, dans ce cas, que les busards ont été exposés aux rodenticides AVKs utilisés en tant que biocides (dans et autour des bâtiments pour la protection de la santé humaine et des installations), mais aucune donnée n'est disponible sur l'utilisation et la distribution des produits rodenticides sur l'île de la Réunion pendant la période d'étude. De plus, lorsque des renseignements précis sur les produits appliqués sont disponibles, une interprétation

rationnelle peut être biaisée par le fait que certaines formulations d'appâts rodenticides puissent contenir des traces d'autres substances actives que celles indiquées sur l'étiquette (Geduhn *et al.*, 2014). Ceci a d'ailleurs été observé par notre équipe lors de dosages réalisés sur des appâts achetés en coopérative agricole sur l'île.

La diféthialone était la substance active la moins retrouvée dans nos échantillons. Les informations dont nous disposons suggèrent que les appâts contenant cette substance active n'ont jamais été utilisés en plein champ pour la protection des cultures. Ainsi, l'exposition résulterait plutôt d'une utilisation biocide dans les zones urbaines, même si des abus ne peuvent être exclus. La diféthialone, tout comme le brodifacoum sont parmi les rodenticides AVKs les plus toxiques pour les oiseaux (ex. DL_{50} aiguë de la diféthialone : 0,26 mg/kg de poids corporel pour le Colin de Virginie, Erickson et Urban, 2004). De ce fait, sa distribution en extérieur devrait être restreinte, comme c'est déjà le cas au Royaume-Uni (Buckle et Prescott, 2018).

Le difénacoum présente la plus forte occurrence mesurée dans nos échantillons, tandis que les concentrations mesurées relativement faibles peuvent s'expliquer par sa persistance modérée dans les tissus animaux par rapport à d'autres SGARs et/ou par une exposition fréquente mais limitée. L'empoisonnement par le difénacoum semble peu probable notamment du fait que les concentrations mesurées pour cette substance active dans nos échantillons étaient toujours < 100 ng/g. Il n'est cependant pas exclu qu'il contribue à l'empoisonnement lorsqu'un même animal est exposé à plusieurs substances actives. Selon Grollier et Soufflet (2011) et selon nos observations personnelles, le difénacoum est utilisé en zone urbanisée mais est parfois également appliqué en cultures de canne à sucre.

4.2.2 Proximité avec les zones de culture, notamment de canne à sucre

Notre étude suggère que l'utilisation de rodenticide dans les cultures, notamment de canne à sucre, semble conduire à une exposition plus forte du busard. En effet, les concentrations totales de rodenticides et plus spécifiquement du brodifacoum ont tendance à être plus élevées lorsque les cultures de canne à sucre atteignent 25 % de la superficie communale. Entre 1999 et 2011, seules les données qualitatives des substances actives utilisées en canne à sucre sont disponibles (Grollier et Soufflet, 2011). Entre 2012 et 2016, ces données peuvent être complétées par la FREDON Réunion (données non publiées). Selon ces données, jusqu'en 2013, des appâts à base de chlorophacinone ou de bromadiolone étaient proposés aux agriculteurs. En 2014, l'utilisation du brodifacoum a été introduite, puis en 2015 et 2016, la bromadiolone et le difénacoum ont été également distribués. Ces données ne correspondent pas entièrement à la tendance interannuelle que nous avons observée pour les substances actives les plus détectées dans nos échantillons. L'exposition à la bromadiolone et à la chlorophacinone a varié au cours du temps en montrant par exemple un pic d'individus exposés à la chlorophacinone en 2008. Dans le même temps, les concentrations hépatiques en brodifacoum ont augmenté à partir de 2012, soit deux ans avant l'année à laquelle nous avons relevé son utilisation en cultures de canne à sucre. Toutefois, seuls deux cas d'empoisonnement potentiel au brodifacoum ont été enregistrés entre 1999 et 2013, alors que 12 cas ont été enregistrés pour la période 2014-2016 (période à laquelle il semble avoir été utilisé dans les cultures de canne). Nous pouvons supposer que l'application après 2014 du brodifacoum en canne à sucre a conduit à une exposition élevée et à un nombre d'empoisonnements potentiels de busards plus important au cours des trois dernières années.

4.2.3 Densités de couples nicheurs et exposition aux rodenticides

Nous avons constaté une relation positive claire entre les concentrations hépatiques mesurées et la densité de couples nicheurs. Ceci rend malheureusement plus probable

l'exposition des oiseaux vivant dans les zones de ressources les plus productives pour l'espèce. Ainsi, si les zones qui accueillent de grandes populations de rongeurs sont attrayantes pour le Busard de Maillard en raison de la forte disponibilité des proies, elles peuvent devenir des pièges écologiques pour ces prédateurs de rongeurs lorsque les rodenticides sont intensivement répandus. Il en résulte une augmentation de l'exposition et de l'empoisonnement des busards et confirme les observations déjà réalisées en Espagne pour d'autres prédateurs (López-Perea et Mateo, 2019).

4.2.4 Vers une meilleure collecte d'information sur le lieu précis de découverte des animaux

Le fait que notre analyse repose parfois sur des données de localisation peu précises (information disponible limitée à la commune de découverte de l'animal), engendre très probablement une plus faible puissance statistique des observations. Une localisation plus précise du lieu de provenance des animaux morts ou accueillis affaiblis en centre de soin permettrait très probablement d'établir des liens plus précis entre les causes d'expositions aux rodenticides et les structures paysagères. De même, l'analyse de prélèvements réalisés sur des oiseaux vivants (ex. échantillonnages sanguins) sur l'ensemble de l'île permettrait de mieux identifier l'exposition et le risque réel pour cette espèce en danger. Une première étude réalisée sur prélèvements sanguins sera présentée dans le chapitre suivant.

4.3 Exposition du Busard de Maillard aux rodenticides AVKs et conséquences pour la population

Interpréter les concentrations de pesticides dans les tissus d'animaux en fonction de la probabilité d'empoisonnement reste une question ouverte. Pour les rodenticides AVKs, Thomas *et al.* (2011) ont montrés que des effets toxiques peuvent se produire chez les rapaces en dessous des concentrations seuils précédemment suggérées, <100-200 ng/g. Lors de l'analyse de différentes espèce, les mêmes auteurs ont montrés que les concentrations hépatiques en rodenticides AVKs de 80 ng/g étaient associées à une probabilité de 20 % pour montrer des signes toxiques. Ils ont également fait ressortir des différences de sensibilité entre les espèces (Thomas *et al.*, 2011) et ont proposé comme compromis pour les rapaces un seuil de 100 ng/g pour les rodenticides AVKs les plus couramment utilisé. En France métropolitaine, le protocole adopté par le réseau SAGIR pour diagnostiquer la cause de mortalité de la faune sauvage repose sur l'étiologie, une nécropsie réalisée par des vétérinaires puis une analyse chimique des tissus en cas de suspicion d'empoisonnement. À ce jour, ce protocole n'a pas été strictement appliqué sur l'île de la Réunion et devrait, à l'avenir, être mis en oeuvre systématiquement lorsqu'une carcasse est collectée. Cela permettrait de mieux diagnostiquer l'empoisonnement et de déterminer les concentrations seuils spécifiques liées à la probabilité d'empoisonnement pour le Busard de Maillard. En outre, les conséquences de l'empoisonnement sur les populations de busard ne peuvent être évaluées tel qu'habituellement en modélisant la population. En effet, les paramètres démographiques tels que le taux de survie ou la productivité demeurent à ce jour inconnus pour cette espèce. La population reproductrice a été estimée à ~150 couples (Grondin et Philippe, 2011). Au cours des deux dernières années de l'étude, 13 busards ont été retrouvés morts avec des concentrations hépatiques en rodenticide AVKs potentiellement létales. On considère généralement qu'une faible proportion de carcasses d'oiseaux, <20 %, sont retrouvées dans la nature (Saucy *et al.*, 2001), ce qui suggère fortement que l'empoisonnement par les EI est sous-estimé. De plus, sur les 36 cas potentiels d'empoisonnement au total, 25 étaient des adultes, alors que la survie des adultes est un paramètre essentiel dans la dynamique des populations de rapaces (Saether et Bakke, 2000).

5 CONCLUSION

Cette étude confirme que l'exposition aux rodenticides AVKs est probablement l'une des principales menaces pour le Busard de Maillard. De nombreux individus retrouvés morts au cours des années 1999-2016 montraient des concentrations hépatiques élevées en substances actives de seconde génération (SGARs) et le nombre de cas que nous pouvons définir comme des empoisonnements potentiels, principalement par le brodifacoum, a augmenté dramatiquement au cours de cette période. La population pourrait être menacée si aucune action n'est entreprise à court terme.

Nos résultats suggèrent fortement que l'application de rodenticides AVKs en champs de canne à sucre et dans les zones urbanisées conduit à l'exposition et l'empoisonnement de busards. Ainsi, la mise en oeuvre rapide d'un plan intégré de contrôle des populations de rongeurs apparaît comme essentielle à la conservation du Busard de Maillard.

À très court terme, les résultats de cette étude demanderaient de remplacer en extérieur l'utilisation d'appâts à base de brodifacoum par des appâts contenant des substances actives moins puissantes. Du fait que la bromadiolone paraît, au regard de nos résultats, comme une source d'exposition et d'empoisonnement très probable, l'utilisation du difénacoum ou de la chlorophacinone pourrait être un substitut acceptable. Cependant, les premiers travaux présentés dans les axes précédents de ce présent rapport nous laissent supposer le développement de souches de rongeurs résistants aux rodenticides AVKs de première génération (ex. chlorophacinone), mais également à ceux de génération intermédiaire tel que la bromadiolone et le difénacoum. Dans ce cas, au regard des enjeux sanitaires et agro-économiques et afin de conserver un contrôle des populations de rongeurs efficace, il apparaîtrait nécessaire d'utiliser des appâts à base de substances actives de dernière génération telles que le brodifacoum ou la diféthialone. Nous l'avons vu, ces substances actives sont également celles qui présentent le plus grand risque d'exposition et d'empoisonnement du Busard de Maillard. Ces différents points soulèvent la nécessité de réfléchir rapidement et de manière globale à un protocole intégré de contrôle des populations de rongeurs à l'échelle de l'île.

Busard de Maillard - Axe 2 : Exposition aux rodenticides de Busards de Maillard accueillis vivants en centre de soin ou prélevés en nature (mesures des résidus sanguins).

- **Mesure par prélèvements sanguins de l'exposition aux rodenticides de Busards de Maillard accueillis vivants en centre de soin,**
- **Mesure par prélèvements sanguins de l'exposition aux rodenticides de Busards de Maillard capturés vivants en nature,**
- **Comparaison des résultats aux données de toxicité connues pour d'autres espèces d'oiseaux.**

Synthèse des principaux éléments :

- Le pourcentage de Busards de Maillard exposés aux rodenticides AVKs est extrêmement important (4 individus sur 12 accueillis en centre de soin entre 2013 et 2017 soit 33% et 21 individus sur les 27 capturés en nature soit 78%). Ces résultats témoignent d'une exposition fréquente et réelle à l'échelle de la population.
- Les concentrations mesurées dans le cadre de cette étude sont très proches de celles mesurées pour des Milans royaux prélevés dans des conditions de en métropole ou encore de Faucons crécerelle en Espagne dans des contextes de contrôle de populations de campagnols en plein champs.
- Malheureusement, les concentrations mesurées dans le sang sont peu indicatives de l'intensité de l'exposition.
- En l'absence d'informations sur d'éventuels signes cliniques, il reste difficile de mettre en relation toxicité et concentrations mesurées.
- Il reste également très difficile de comparer nos résultats sur Busard de Maillard à des données de mesure d'exposition et de toxicité connues sur d'autres espèces d'oiseaux et encore plus difficile de les comparer à des données issues de mammifères.
- **Ces différents points soulèvent à nouveau la nécessité de réfléchir rapidement et de manière globale à un protocole intégré de contrôle des populations de rongeurs à l'échelle de l'île.**

1 OBJECTIFS ET CONTEXTE

1.1 Objectifs

Mesurer l'exposition aux rodenticides AVKs de Busards de Maillard vivants selon deux protocoles d'échantillonnage de sang.

- **Individus accueillis vivants au centre de soin de la SEOR.**
Il s'agit d'individus retrouvés déficients en nature et rapportés vivants au centre de soin et dont l'état de santé pouvait permettre la réalisation d'un prélèvement de sang.
- **Individus capturés vivants en nature**
Il s'agit d'individus qui ont été capturés et manipulés dans un objectif de mise en œuvre d'une autre étude portant sur l'étude du régime alimentaire ou du suivi de déplacement et sur lesquels il a pu être réalisé également un prélèvement de sang (Autorisation CRBPO/MNHN, Programme de baguage personnel n°577).

1.2 Contexte

Les animaux intégrés à cette étude ont été collectés par la SEOR.

Les analyses toxicologiques ont été réalisées par Isabelle Fourel, USC 1233 Rongeurs sauvages – INRA VetAgro Sup Lyon.

L'analyse, l'interprétation et la discussion des résultats a été réalisée par Mickaël Sage, Faune INNOV'.

Cette étude est, à notre connaissance, la première à s'être intéressée à la mesure de l'exposition aux rodenticides du Busards de Maillards sur des animaux vivants. Elle a été réalisée sur des animaux apportés en centre de soin entre 2013 et 2017 ainsi que sur des animaux prélevés en nature entre 2016 et 2018. Si cette première approche comporte de faibles effectifs, ses résultats n'en sont pas moins très intéressants. La mise en œuvre de ces deux types de mesures se poursuit actuellement et permettra de disposer d'une approche à plus large échelle spatiale et temporelle.

2 METHODOLOGIE

2.1 Analyses toxicologiques

Les AVKs ont été dosés dans le sang prélevés sur des animaux soit accueillis au centre de soin de la SEOR, soit sur des animaux capturés en nature. La méthode analytique utilisée est décrite par Fourel *et al.* (2016) et utilise une chaîne analytique LC-MS/MS, méthode qui combine la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Cette méthode a été partiellement décrite dans le premier chapitre de ce rapport « Rongeurs - Axe 1 : Exposition des rongeurs cibles après un traitement rodenticide en canne à sucre – écotoxicologie et résistance ». Elle permet de doser simultanément les huit substances actives homologuées en Europe pour les produits rodenticides AVKs (le coumafène, le coumatétralyl, la chlorophacinone, la bromadiolone, le difénacoum, le flocoumafène, le brodifacoum et la diféthialone). Ce sont les substances actives les plus couramment utilisées dans le monde en tant que rodenticide. Une courbe de calibration a été réalisée et a permis la quantification des différents AVKs dans les échantillons. La LOQ (Limit Of Quantification) correspond au point le plus bas de la courbe de calibration, elle est ici comprise selon les substances actives entre 0,38 et 0,59 ng/mL. La LOD (Limit Of Detection) a été définie comme la moitié de la LOQ soit entre 0,19 et 0,30 ng/mL.

2.2 Origine des animaux prélevés

2.2.1 Animaux accueillis en centre de soin

Un échantillon de sang a été prélevé sur 12 Busards de Maillard rapportés vivants au centre de soin de la SEOR entre 2013 et 2017 pour lesquels l'état de santé pouvait le permettre. Lorsque cela était possible, leur âge et leur sexe ont été déterminés (Tableau 8). Ils

provenaient des communes de Saint-Louis (n=1), Sainte-Suzanne (n=1), Saint-Benoit (n=1), Sainte-Marie (n=1), Bras-Panon (n=1), Le Tampon (n=4), Saint-Leu (n=1), Sainte-Rose (n=1) et Saint-Paul (n=1). Du fait d'un effectif trop faible, il n'est pas pertinent de réaliser une analyse spatiale des résultats obtenus. Nous proposons d'interpréter les résultats uniquement de manière non spatialisée.

Tableau 8. Age et sexe des Busards de Maillard accueillis au centre de soin de la SEOR entre 2013 et 2017 dont le sang a été prélevé et analysé pour détection éventuelle d'AVKs.

Age	Mâle	Femelle	Non défini	Total
Adulte	4	3	0	7
Immature	1	1	0	2
Jeune	0	1	2	3
Total	5	5	2	12

Parmi les 12 prélèvements, 6 présentaient une quantité de sang trop faible ou un échantillon qui semblait dilué dans un solvant incolore de nature inconnue (possiblement de l'Ethanol à 70%) pour permettre la réalisation d'une analyse quantitative. Dans ce cas, seul un dosage qualitatif a pu être réalisé (AVK détecté ou non, mais non quantifiable). Les échantillons datant de 2013 et 2014 (n=5) étaient difficilement exploitables analytiquement. La réalisation de prélèvements de sang exploitables en chimie analytique n'est possible que par un personnel formé, ce qui n'était à cette période malheureusement pas toujours le cas au sein du centre de soin.

2.2.2 Animaux prélevés en milieu naturel

Un échantillon de sang a été prélevé sur 27 Busards de Maillard capturés en milieu naturel entre le 22 juin 2016 et le 19 mars 2018. Lorsque cela était possible, leur âge et leur sexe a été déterminé (Tableau 9). Ils provenaient des communes de Bras-Panon (n=13), la Possession (n=2), les Avirons (n=1), Saint-Benoit (n=5), Saint-André (n=1), le Tampon (n=3) et Saint-Leu (n=2). Du fait d'un échantillonnage parfois très déséquilibré entre communes mais également de difficultés analytiques rencontrées du fait de trop faibles quantités de sang prélevées (n=5) ou de mauvaise conservation de certains échantillons (sang coagulé n=4), il nous est difficile de réaliser une analyse spatiale des données quantitatives qui soit facilement interprétable. Pour ces raisons, nous proposons d'interpréter les résultats uniquement de manière non spatialisée.

Tableau 9. Age et sexe des Busards de Maillard capturés en nature dont le sang a été prélevé et analysé pour détection éventuelle d'AVKs.

Age	Femelle		Mâle		Total
	Certain	Non confirmé	Certain	Non confirmé	
Adulte	3		11		14
Immature	2		2		4
Jeune	1	3		5	9
Total	6	3	13	5	27

3 RESULTAT

3.1.1 Animaux accueillis en centre de soin

Les AVKs retrouvés dans les prélèvements de sang des animaux accueillis en centre de soin sont le difénacoum et le brodifacoum. Pour les individus positifs, les quantités retrouvées sont comprises entre 1,2 et 10,9 ng/mL. L'ensemble des résultats est présenté dans la Figure 18 et le Tableau 10.

Aucun des jeunes ne présentait de résidus d'AVK détectables. Les deux immatures présentaient des traces d'exposition, la femelle au difénacoum (1,2 ng/mL), le mâle au brodifacoum (1,7 ng/mL). Un mâle adulte présentait des traces d'exposition au brodifacoum (1,6 ng/mL). Un second mâle adulte présentait des traces d'exposition au brodifacoum (1,6 ng/mL) ainsi qu'au difénacoum (10,9 ng/mL). Au total : 4 des 12 animaux prélevés (33%) présentaient des traces d'exposition au minimum à un AVK, un était multi exposé (brodifacoum + difénacoum, concentration additive : 13,9 ng/mL). Seul ce dernier présentait une concentration totale supérieure à 10 ng/mL. La médiane des concentrations mesurées en difénacoum est de 6,0 ng/mL ($n=2$; min = 1,2 ; max = 10,9 ; $Q1 = 3,60$; $Q3 = 8,46$). La médiane des concentrations mesurées en brodifacoum est de 1,7 ng/mL ($n=3$; min = 1,6 ; max = 3,0 ; $Q1 = 1,61$; $Q3 = 2,34$). La concentration médiane pour les individus positifs, toutes substances actives confondues, est de 1,6 ng/mL (min = 1,2 ; max = 13,9 ; $Q1 = 1,47$; $Q3 = 4,72$).

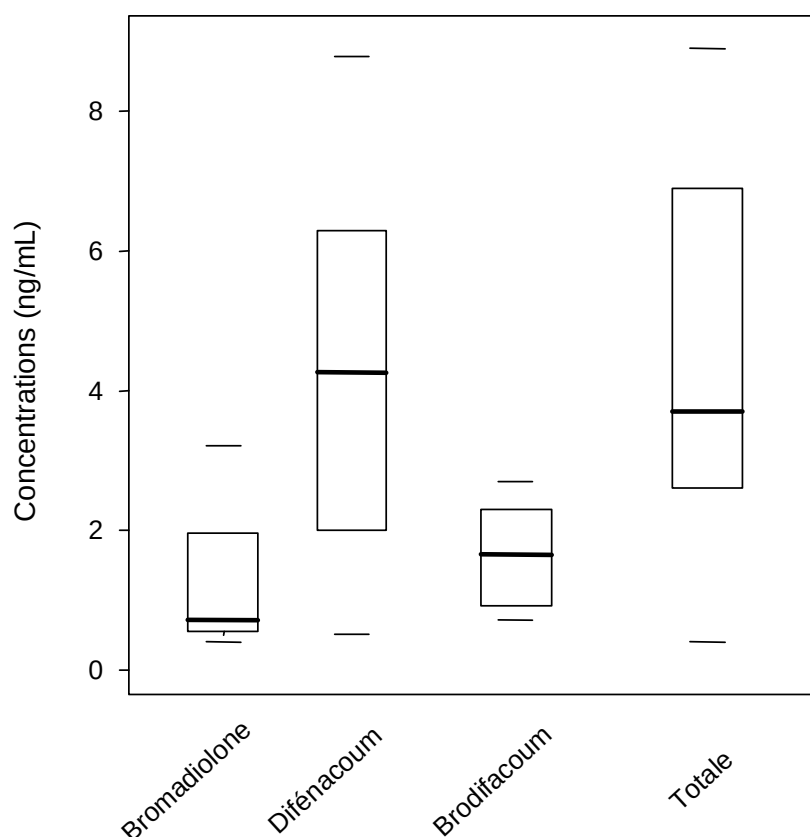


Figure 18. Représentation en boîte à moustache (boxplot) des concentrations mesurées dans le sang des Busards de Maillard accueillis en centre de soin.

3.1.2 Animaux prélevés en milieu naturel

Les AVKs retrouvés dans les échantillons des animaux prélevés en milieu naturel sont la bromadiolone, le difénacoum et le brodifacoum. Les quantités retrouvées sont toutes inférieures à 8.9 ng/mL. L'ensemble des résultats est présenté dans la Figure 19 et le Tableau 11.

Si l'on analyse ces données toutes classes d'âge confondues, parmi les 27 individus prélevés, 21 sont positifs (78%) dont 10 (37%) ne contenant qu'une substance active, 10 (37%) contenant 2 substances actives différentes et 1 (4%) contenant 3 substances actives différentes.

La bromadiolone est détectée dans 5 échantillons (19%) avec une concentration médiane pour les positifs de 0,7 ng/mL (min = 0,4 ; max = 3,2 ; Q1 = 0,58 ; Q3 = 1,98), le difénacoum dans 16 échantillons (59%) avec une concentration médiane pour les positifs de 4,3 ng/mL (min = 0,5 ; max = 8,8 ; Q1 = 2,15 ; Q3 = 6,18) et le brodifacoum dans 12 échantillons (44%) avec une concentration médiane pour les positifs de 1,6 ng/mL (min = 0,7 ; max = 2,7 ; Q1 = 0,95 ; Q3 = 2,22). La concentration médiane pour les individus positifs, toutes substances actives confondues, est de 3,7 ng/mL (min = 0,4 ; max = 8,9 ; Q1 = 2,61 ; Q3 = 6,92).

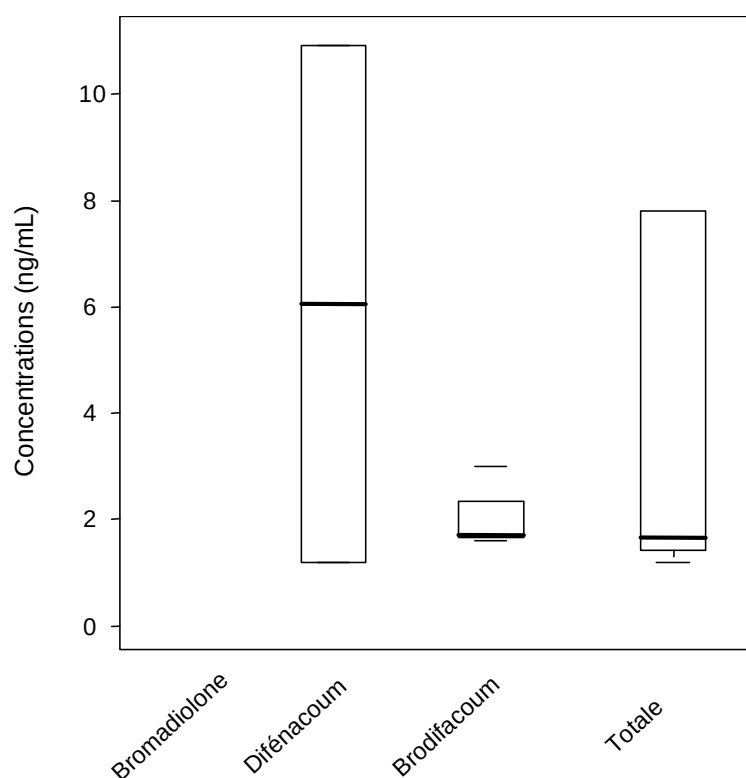


Figure 19. Représentation en boîte à moustache (boxplot) des concentrations mesurées dans le sang des Busards de Maillard prélevés en nature.

Parmi les 9 jeunes prélevés, 5 présentaient des résidus d'une substance active, 1 de deux substances actives différentes et 1 de trois substances actives différentes. Parmi ces 9 échantillons, 7 étaient donc positifs (78%) dont un pour lequel il n'a pas été possible de quantifier la substance active (quantité trop faible de sang prélevé) et un pour lequel l'échantillon analytique a été prélevé par pesée (sang coagulé). Sur l'ensemble des jeunes individus, si l'on additionne toutes les substances actives détectées, la concentration médiane en AVKs est de 3,8 ng/mL (min = 0 ; max = 8,8 ; Q1 = 0,33 ; Q3 = 6,37).

Parmi l'ensemble des analyses, 6 jeunes ont été capturés dans 3 nids différents (3 fratries de 2). Pour la première fratrie (La possession, Ravine Grande Chaloupe nid 17-2), aucun des deux jeunes ne montrait de résidus d'AVKs détectables. Pour la seconde fratrie (Bras Panon nid 17-6), les deux jeunes montraient une exposition uniquement au difénacoum avec des concentrations similaires (7,5 et 5,7 ng/mL). Pour la dernière fratrie (Le Tampon, Plaine des Cadres, nid 17-15), l'un des jeunes montrait une exposition uniquement à la bromadiolone (0,4 ng/mL) alors que le second montrait une exposition à la fois à la bromadiolone, au difénacoum et au brodifacoum (0,7 ; 0,5 et 0,7 ng/mL, respectivement).

Parmi les 4 immatures prélevés, 3 étaient positifs (75%) dont un pour lequel il n'a pas été possible de quantifier la substance active (quantité trop faible de sang prélevé). Aucun de ces individus n'était multi-exposé. Sur l'ensemble des individus immatures, si l'on additionne toutes les substances actives détectées, la concentration médiane en AVKs est de 2,6 ng/mL (min = 0 ; max = 3,5 ; Q1 = 1,28 ; Q3 = 3,03).

Parmi les 14 adultes prélevés, 11 étaient positifs (79%) dont 2 à une substance active et 9 à deux substances actives différentes. Pour 3 individus, la quantité de sang prélevée était insuffisante pour permettre un dosage quantitatif et seule une détection de substance active a pu être mise en œuvre. Pour 3 autres individus, l'échantillon analytique a été prélevé par pesée (sang coagulé). Sur l'ensemble des individus immatures, si l'on additionne toutes les substances actives détectées, la valeur médiane est de 3,1 ng/mL (min = 0 ; max = 8,9 ; Q1 = 1,17 ; Q3 = 6,83).

4 DISCUSSION

Aucun des dosages réalisés ne montre la présence de substances actives de première génération. Toutes les substances actives détectées sont de seconde génération (bromadiolone, difénacoum et brodifacoum). Ceci est cohérent avec une rémanence plus importante des molécules de seconde génération aussi bien dans les appâts, dans les tissus des espèces cibles que dans les tissus des espèces non cibles (Eason *et al.* 2002 ; Sage *et al.* 2007 ; Vandenbroucke *et al.* 2008). Nous attirons l'attention sur le fait qu'il s'agisse de substances actives présentant également une plus forte toxicité par rapport aux substances actives de première génération (Erickson et Urban, 2002).

Les échantillons coagulés entraîne un travail analytique légèrement plus long que lorsque le sang collecté reste liquide, mais ne rendent pas les mesures de concentrations moins précises.

Un nombre non négligeable d'échantillons (6/12 prélevés en centre de soin et 5/27 prélevés en nature) présentaient par contre une quantité insuffisante de sang pour permettre un dosage dans les conditions validées par la méthode analytique. Les valeurs annoncées pour ces échantillons sont de ce fait, à minima, moins précises ou alors permettent uniquement de donner un résultat qualitatif (présence / absence sans quantification). Cela contribue à réduire le nombre d'échantillons exploitables et l'interprétation de ces 11 échantillons est donc malheureusement moins aisée.

Tableau 10. Résultats analytiques pour les Busards de Maillard accueillis en centre de soin.

Age	Date de prélèvement	Commune	Lieu-dit	Coordonnées		Sexe	Remarque	Nb sub. act. détectées	Concentration (ng/mL)			
				X	Y				Bromadiolone	Difénacoum	Brodifacoum	Totale
Jeune	17/10/2013	Sainte-Suzanne	na	-	-	F?	Q. faible + liq. Incol					
	17/04/2014	Bras-Panon	na	-	-	NA	Q. faible + liq. Incol					
	12/07/2017	Tampon (Le)	na	-	-	F						
Immature	03/05/2017	Tampon (Le)	Bérive	-	-	M		1			1.7	1.7
	22/06/2017	Saint-Leu	na	-	-	F		1		1.2		1.2
Adulte	14/04/2013	Saint-Louis	na	-	-	M	Q. faible					
	03/02/2014	Saint-Benoit	na	-	-	F						
	03/03/2014	Sainte-Marie	na	-	-	F	Vide - Rinc. Acet.					
	23/11/2016	Tampon (Le)	na	-	-	M		1			1.6	1.6
	30/06/2017	Tampon (Le)	na	-	-	M		2		10.9	3.0	13.9
	03/07/2017	Sainte-Rose	Grand Brulé	-	-	F	Q. faible					
	31/10/2017	Saint-Paul	Eglise de la Saline les Hauts	-	-	M	Q. faible					
									Min.	1.2	1.6	1.2
									Max.	10.9	3.0	13.9
									Médiane	6.0	1.7	1.6
									Quartile1	3.60	1.61	1.47
									Quartile3	8.46	2.34	4.72

Age	Date de prélèvement	Commune	Lieu-dit	Coordonnées		Sexe	Remarque	Nb sub. act. détectées	Concentration (ng/mL)			
				X	Y				Bromadiolone	Difénacoum	Brodifacoum	Totale
Adulte	01/11/2016	Bras-Panon	Bras-Sec	359970	7676408	M		1			1.6	1.6
	01/11/2016	Bras-Panon	Bras-Sec	359970	7676408	M	Q. faible	2	d		d	d
	02/11/2016	Bras-Panon	Bras-Sec	360257	7676440	M	Q. faible	2		d	d	d
	02/11/2016	Bras-Panon	Bras-Sec	360257	7676440	M						
	04/11/2016	Bras-Panon	Bras-Sec	360175	7676514	M						
	05/12/2016	Bras-Panon	Bras-Valentin	359586	7675610	F		2		1.2	2.3	3.5
	12/06/2017	Avirons (Les)	Tevelave	328854	7651896	M	Q. faible					
	15/06/2017	Saint-Benoit	Sainte-Anne	364160	7663948	M		2		6.3	2.6	8.9
	16/06/2017	Bras-Panon	Bras-Sec	360257	7676440	F		2		5.1	1.7	6.8
	26/10/2017	Bras-Panon	Bras-Valentin	359586	7675610	F		2		4.8	2.1	6.9
	13/03/2018	Saint-Leu	Grand Fond les Hauts	326271	7655040	M	Sang coag.	1		3.7		3.7
	14/03/2018	Tampon (Le)	Pont d'Yves	345712	7652875	M	Sang coag.	2		1.7	0.9	2.6
	16/03/2018	Saint-Benoit	Sainte-Anne	363935	7664351	M		2		2.0	0.7	2.8
	19/03/2018	Saint-benoit	Sainte-Anne	363950	7664352	M	Sang coag.	2		6.7	1.2	7.8
Immature	19/06/2017	Saint-André	SEOR	359768	7685097	M	Q. faible	1		d		d
	21/06/2017	Saint-Benoit	Sainte-Anne	364160	7663948	F		1		2.6		2.6
	11/03/2018	Saint-Leu	Grand Fond les Hauts	326279	7654675	F						
	19/03/2018	Saint-benoit	Sainte-Anne	363998	7664455	M		1		3.5		3.5
Jeune	22/06/2016	Bras-Panon	Bras-Patrick, nid16-4	359305	7676435	F?	Sang coag.	2	3.2		2.7	6.0
	28/10/2016	Bras-Panon	Bras-Sec	360110	7676292	F?	Q. faible	1	d			d
	31/03/2017	Possession (La)	Ravine Grande Chaloupe, nid17-2	331077	7687122	M?						
	31/03/2017	Possession (La)	Ravine Grande Chaloupe, nid17-2	331077	7687122	M?						
	10/07/2017	Bras-Panon	nid17-6	360619	7676019	M?		1		7.5		7.5
	10/07/2017	Bras-Panon	nid17-6	360619	7676019	M?		1		5.7		5.7
	11/10/2017	Tampon (Le)	Plaine des Cafres, nid17-15	346784	7651921	F?		1	0.4			0.4
	11/10/2017	Tampon (Le)	Plaine des cafres, nid17-15	346784	7651921	M?		3	0.7	0.5	0.7	1.9
	20/10/2017	Bras-Panon	Bras-Valentin	359586	7675610	F		1		8.8		8.8
								Min.	0.4	0.5	0.7	0.4
								Max.	3.2	8.8	2.7	8.9
								Médiane	0.7	4.3	1.6	3.7
								Quartile1	0.58	2.15	0.95	2.61
								Quartile3	1.98	6.18	2.22	6.92

Coordonnées cartographiques : WGS 84 UTM zone 40 sud.

Q. faible : Quantité de sang trop faible dans l'échantillon pour permettre une analyse qualitative

Sang coag. : Sang coagulé ne permettant pas une prise d'échantillon liquide mais uniquement par pesée.

d : Détection de la substance active mais quantification impossible

Tableau 11. Résultats analytiques pour les Busards de Maillard capturés en milieu naturel.

4.1 Concentrations mesurées vs signes cliniques

Dans le sang ou le plasma, les concentrations sont peu indicatives de l'intensité de l'exposition. En effet, la pharmacocinétique des AVKs est biphasique avec une élimination rapide au cours des premiers jours (ex. Kemikalieinspektionen, 2006). La première demi-vie est souvent de quelques heures, par exemple 12,7 à 19,4 heures dans plasma de renards ayant consommé des rongeurs intoxiqués à la bromadiolone (Sage *et al.* 2010) ou encore comprise entre 3,65 et 5,62 heures pour des poules exposées à de la bromadiolone (Montaz 2013). S'en suit ensuite une élimination plus lente au cours de laquelle la seconde demi-vie peut aller jusqu'à plusieurs centaines de jours selon les substances actives. L'utilisation d'un appareillage LC-MS/MS permet de détecter les molécules à minima pendant plusieurs semaines voire plusieurs années après leur absorption (faible seuil de détection par les outils analytiques et grande rémanence des SGARs dans les tissus).

Deux points doivent de ce fait être soulignés :

- Il est difficile de juger de l'intensité de l'exposition aux AVKs au vu des concentrations sanguines mesurées et donc d'en déduire le caractère léthal ou sub-léthal de celle-ci.
- Il est difficile de relier des concentrations identiques pour une même substance active mesurées chez deux individus différents comme étant le résultat d'une exposition identique. Pour l'un, l'exposition peut être par exemple plus importante mais plus ancienne de quelques heures ou quelques jours alors que pour l'autre elle peut être plus faible mais plus récente. De surcroît, nous ne pouvons déterminer si l'exposition est ponctuelle ou récurrente.

De manière à illustrer nos propos, le graphique présenté en Figure 20 présente l'évolution des concentrations en bromadiolone dans le plasma de quatre renards ayant consommés en captivité pendant 2 ou 5 jours des campagnols intoxiqués à la bromadiolone à des concentrations similaires à celles retrouvées en nature (extrait de Sage *et al.* 2010). A noter que les concentrations sont présentées dans la même unité, le ng/mL. La demi-vie plasmatique est de 12,7 ; 19,4 ; 18,2 et 72,2 heures pour les individus F2, F5.1, F5.2 et F 5.3 respectivement. Nous pouvons observer une très rapide diminution des concentrations dès l'arrêt de l'exposition (après J2 pour le renard F2 et après J5 pour les renards F5). Nous remarquons également la mesure de concentrations identiques juste après exposition (quelques dizaines de ng/mL) pour les individus faiblement exposés (F2 et F5.3) alors qu'il est nécessaire d'attendre plusieurs jours pour observer des concentrations similaires chez les individus fortement exposés (F5.1 et F5.2).

Les concentrations maximales observées chez les renards lors de leur exposition varient entre 42 ng/mL pour l'individu le moins exposé (F2) à 255 ng/mL pour l'individu le plus exposé (F5.1). En fonction des individus, les concentrations plasmatiques mesurées sont de l'ordre de 1 à 2 ng/mL (concentrations très souvent observées dans le plasma des busards lors de la présente étude) entre 7 et 12 jours après la fin de l'exposition des renards.

Du fait d'une toxicité extrêmement variable entre espèces et notamment entre mammifères et oiseaux, il nous est cependant très difficile d'extrapoler les données observées sur le renard en captivité à celles observées sur le Busard de Maillard en nature. La DL₅₀ connue pour la bromadiolone chez l'espèce la plus proche du renard est par exemple de 10 mg/kg de masse corporelle chez le chien (USEPA, 1998) alors qu'elle est de 138 à 170 mg/kg de masse corporelle chez le Colin de Virginie (USEPA, 1998) ou de 1 600 mg/kg de masse corporelle chez la caille (WHO, 1995). Quelques exemples de variations de DL₅₀ connues chez différentes espèces d'oiseaux et de mammifères sont proposées pour chaque substance active dans Tableau 12.

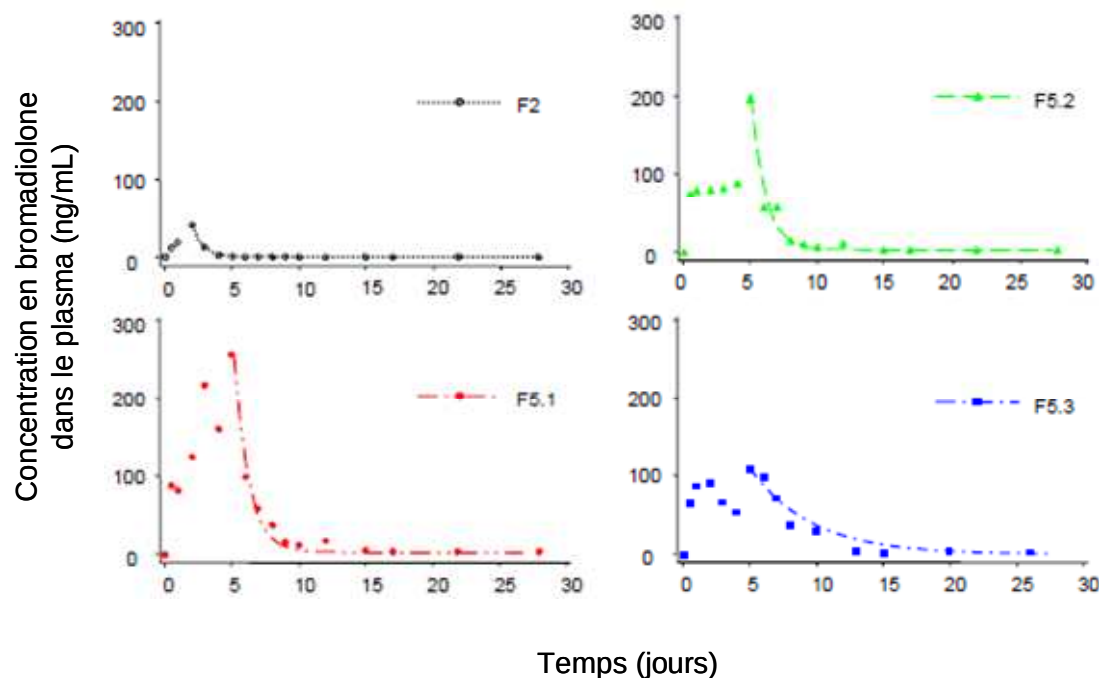


Figure 20. Exemple de cinétique d'un AVK, la bromadiolone, dans le plasma de quatre renards exposés pendant 2 ou 5 jours à des campagnols intoxiqués à des concentrations retrouvées en nature. Le renard F2 a été faiblement exposés pendant 2 jours. Les renards F5.1 et F5.2 ont été fortement exposés pendant 5 jours. Le renard F5.3 a été faiblement exposés pendant 5 jours. Les lignes pointillées représentent la courbe modélisée selon le modèle à un compartiment dérivé de Widianarko et Van Straalen (1996). Extrait de Sage et al. (2010).

Tableau 12. DL50 (mg administré/kg masse corporelle) (administration unique par voie orale) indiquées dans les rapports d'évaluation des molécules par l'Union Européenne pour les groupes des oiseaux et des mammifères (la DL50 retenue pour une molécule est celle de l'espèce la plus sensible du taxon i.e. la plus faible DL50 obtenue parmi toutes les espèces testées).

Génération	Molécule	DL50 (mg/kg)	
		Oiseaux	Mammifères
1	Chlorophacinone	257 a	1,48-18,57.d
	Coumafène	>2000 a	1–5 e
	Coumatétralyl	>2000 b	15–30 d
2	Brodifacoum	0,31.c	0,4 d
	Bromadiolone	138 a	0,56-0,84 d
	Difénacoum	56 a	1,8-50 d
	Diféthialone	0,26 a	0,4-0,8 d
	Flocoumafène	24 c	0,13 d

Tests portant sur a : le Colin de Virginie *Colinus virginianus*, b : la Caille du Japon *Coturnix japonica*, c : le Canard colvert *Anas platyrhynchos*, d : le Rat *Rattus sp.*, e : le Cochon *Sus scrofa domesticus*

Une autre étude susceptible d'apporter des éléments de discussion est celle réalisée en exposant des poules rouges (*Galus galus*) oralement par gavage à une dose faible (0,05 mg/kg de masse corporelle) ou à une dose forte (0,5 mg/kg de masse corporelle) (Montaz, 2013). Cette dose forte d'exposition correspond approximativement à celle que peut ingérer un prédateur qui consomme 2 Campagnols terrestres (*Arvicola terrestris*) intoxiqués par jour (Sage *et al.* 2008). Elle est 2,5 à 250 fois inférieure aux DL50 (dose létale médiane) mesurées sur différentes espèces d'oiseaux en laboratoire : le Canard colvert *Anas platyrhynchos* et le Colin de Virginie *Colinus virginianus* respectivement (Kemikalieinspektionen, 2006). Malheureusement en absence de données, il nous est impossible de la comparer à la dose susceptible d'être ingérée en consommant des rats ou souris et à des doses toxicologiques chez les rapaces. L'exposition à une faible dose de bromadiolone (0,05 mg/kg mc) peut être détectée dans le sang de poule pendant au maximum 1 semaine après l'exposition tandis que, dans le cas d'une forte dose (0,5 mg/kg mc), des résidus sanguins sont détectables pendant 4 semaines (Montaz, 2013). Quelque soit la quantité ingérée, les concentrations sanguines maximales sont mesurées une heure après l'exposition (mesures effectuée à T0, T1 et T5 heures). Pour les individus les plus exposés une heure après administration, ces concentrations maximales sanguines sont alors proches de 30 µg/L soit 30 000 ng/mL. Pour les individus les moins exposés, les mêmes concentrations sont proches de 1,4 µg/L soit 1 400 ng/mL. Rappelons que les concentrations médianes observées dans le cadre de cette présente étude toutes substances actives confondues sont de 1,6 et 3,7 ng/mL pour les individus accueillis en centre de soin et ceux prélevés en nature, respectivement. Celles-ci sont donc entre 18 750 et 378 fois inférieures à celles mesurées chez des poules récemment exposées.

Malheureusement, au cours de cette étude, il n'a pas été possible d'établir une relation entre les doses auxquelles ont été exposés les animaux et des éventuels signes cliniques. Le temps de Quick ont par exemple montré d'importantes variations, y compris chez les poules témoins non exposées ou les poules test avant exposition (entre 10,5 s à plus de 200 s pour la poule témoin et de 44,1 s à plus de 200 s à T0 pour les 6 poules exposées). Les mesures réalisées ont été jugées non fiables et par conséquent non valides. Selon la dose ingérée, le temps de demi-vie de la bromadiolone est différent : 5,62h pour les poules exposées à une faible dose et 3,65h pour les poules exposées à une forte dose.

A la fin de l'expérimentation, une poule par groupe de traitement (faible dose, forte dose et témoin) a été autopsiée. Aucune hémorragie interne ou autre signe clinique témoignant d'un effet de rodenticides anticoagulants n'a été décelé.

4.2 Comparaison entre substances actives

Tout comme la comparaison de différentes concentrations d'une même substance active mesurées chez plusieurs individus nous semble hasardeuse, la comparaison d'une même concentration pour différentes substances actives nous semble également difficile. Pour ces raisons, il nous est impossible de certifier que deux individus qui présentent une même concentration dans le sang de deux substances actives différentes ont été exposés à une même quantité et présentent de mêmes signes cliniques d'intoxications. Le paragraphe ci-dessous illustre nos propos.

S'il est possible de trouver dans la littérature des données de persistance de certains AVKs rodenticides dans le sang pour quelques espèces d'oiseaux (caille et canard notamment), à notre connaissance, peu d'informations comparatives sont disponibles concernant la pharmacocinétique de différents AVKs rodenticides chez une même espèce. De plus, à notre connaissance, aucune donnée de pharmacocinétique de telles substances actives n'est disponible chez les rapaces.

L'étude qui nous semble la mieux adaptée pour illustrer les différences de persistance entre substances actives chez une même espèce est celle de Vandebroucke *et al.* (2008) chez la souris. Selon cette étude, le brodifacoum possède la persistance sanguine la plus élevée avec, pour une dose ingérée de 0,875 mg/kg, une demi vie chez les souris de 91,7 j ; celles de la bromadiolone, la chlorophacinone, le difénacoum, le flocoumafène et la diféthialone étant de 33,3 ; 11,7 ; 20,4 ; 26,2 et 38,6 j respectivement. Il nous est de ce fait impossible de certifier que la femelle immature prélevée en centre de soin le 22/06/2017 a été exposée à la même quantité de difénacoum (concentration sanguine en difénacoum de 1,2 ng/mL) que le mâle adulte capturé en nature le 13/03/2018 au brodifacoum (concentration sanguine en brodifacoum également de 1,2 ng/mL).

4.3 Nombre d'individus exposés

Le pourcentage d'individus exposés est extrêmement important (4 individus sur 12 accueillis en centre de soin entre 2013 et 2017 soit 33% et 21 individus sur les 27 capturés en nature soit 78%). Si l'utilisation d'un appareillage LC-MS/MS permet de détecter les molécules à de très faibles concentrations, donc pouvant résulter de très faibles expositions, ces résultats témoignent tout de même d'une exposition fréquente et réelle à l'échelle de la population.

Contrairement à ce que nous aurions pu supposer, les individus accueillis en centre de soin et donc supposés « déficients » sont proportionnellement moins exposés que les individus capturés en nature. Les concentrations les plus élevées ont cependant été mesurées sur un animal accueilli en centre de soin en juin 2017 (13,9 ng/mL pour la somme de deux substances actives, le difénacoum et le brodifacoum).

Pour les animaux prélevés en nature, la molécule la plus souvent détectée est le difénacoum, puis le brodifacoum. La bromadiolone est peu détectée. Le difénacoum est le principe actif retrouvé le plus fréquemment avec les concentrations les plus importantes, alors qu'il s'agit de la substance active de seconde génération qui est susceptible de présenter la rémanence la plus faible dans le sang des animaux exposés (Vandebroucke *et al.* 2008). De ce fait, nous pouvons supposer qu'il s'agisse d'une substance active couramment utilisée durant la période de notre étude.

Les concentrations de brodifacoum étant plus faibles (inférieures à 3 ng/mL) et le brodifacoum étant très rémanent (demi-vie supérieur à 90 jours dans le plasma de souris - Vandebroucke *et al.* 2008), elles pourraient être significatives d'une exposition ancienne par rapport à la réalisation du prélèvement ou alors de la consommation de proies anciennement exposées. Ces données d'exposition du Busard de Maillard seraient à mettre en parallèle avec les données de quantités d'appâts rodenticides utilisés à l'échelle de l'île. Celles-ci restent cependant difficilement disponibles.

Aucun des jeunes individus accueillis en centre de soin ne présentait de résidus d'AVKs détectables. En centre de soin, seuls des immatures ou des adultes semblent avoir été exposés. Il est cependant extrêmement inquiétant que parmi les 9 jeunes capturés en nature, 7 (78%) présentent déjà des résidus d'AVKs, dont certains à des concentrations relativement importantes par rapport aux autres valeurs mesurées dans le cadre de cette étude (8,8 ng/mL pour le difénacoum). Ces résultats laissent supposer que les Busards de Maillard sont exposés directement au nid et dès leur plus jeune âge par la consommation de proies contaminées apportées par les adultes.

4.4 Comparaison à d'autres études réalisées sur rapaces en nature

La plupart des études qui se sont intéressées à l'évaluation de l'exposition aux rodenticides en nature de prédateurs ou de charognards repose le plus souvent sur la mesure des résidus présents dans le foie d'animaux retrouvés morts. A notre connaissance, peu d'études sont disponibles sur la mesure de l'exposition de rapaces par dosage sanguin effectués sur des animaux capturés vivants en nature.

Les deux études qui se rapporteraient le plus à celle présentée ici seraient celles publiées par et par Martínez-Padilla *et al.* (2017) sur le Faucon crécerelle (*Falco tinnunculus*) et Coeurdassier *et al.* (2014) sur le Milan royal (*Milvus milvus*).

Sur le Faucon crécerelle, Martínez-Padilla *et al.* (2017) ont montrés dans un contexte de contrôle de populations de Campagnols des champs en Espagne que 16,9 % (n= 112) des jeunes au nid présentaient des résidus de bromadiolone détectable dans le sang avec une concentration moyenne de $1,459 \pm 0,334$ ng/mL sur les seuls individus positifs. Les jeunes avec présence de bromadiolone dans leur sang, quelle que soit la concentration, avait alors une masse corporelle inférieure de 6,7 % à celle des individus sans bromadiolone détectable.

Selon Coeurdassier *et al.* (2014) sur le Milan royal, sur 121 animaux échantillonnés en France métropolitaine entre 2006 et 2013, 48% présentaient des résidus de rodenticides dans leur sang. La bromadiolone était la substance active la plus couramment détectée (30%) suivie de la difethialone (21%). Sur un site en particulier (Auvergne), 80% des jeunes prélevés au nid montraient des résidus de bromadiolone. Sur cette zone d'étude notamment, cette substance active est couramment utilisée en protection des cultures pour contrôler les populations de Campagnols en milieu agricole. Un programme de recherche financée par la région Auvergne-Rhône-Alpes est actuellement en cours pour trouver des campagnolicides plus respectueux de la biodiversité soit moins toxiques pour les prédateurs des campagnols.

La population de Busard de Maillard sur l'île semble plus couramment exposée que celle de Milan royal en France métropolitaine puisque nous montrons que 78% des individus échantillonnés en nature montrent des résidus de rodenticides, que ce soit toute classe d'âge confondue tout comme chez les jeunes capturés au nid.

Les concentrations mesurées dans les trois études restent comparables et sont de l'ordre du ng/mL avec des valeurs maximales pouvant atteindre 12 ng/mL pour la bromadiolone à 16 ng/mL pour le difethialone dans l'étude réalisée sur Milans royaux.

Montaz (2013) avait montré des variations de concentrations sanguines en AVKs faibles entre les juvéniles de Milans royaux d'un même nid. C'est ce que nous observons pour deux des trois nichées de la présente étude (l'une sans résidus d'AVKs détectable pour les deux jeunes et l'autre avec des concentrations similaires d'une même substance active pour les deux jeunes). La dernière montre cependant des différences entre les deux jeunes puis que l'un ne semble exposé qu'à une substance active (bromadiolone) alors que l'autre est exposé à trois (bromadiolone, difénacoum, brodifacoum). Sur les Milans royaux, aucune corrélation n'avait été détectée entre le niveau d'exposition des juvéniles aux AVKs et leur condition corporelle, leur hématocrite ou la productivité de la nichée (Montaz 2013).

Pistes de réflexions nécessaires à la définition d'un plan de contrôle des populations de rongeurs sur l'île de la Réunion

- Efficacité des opérations de contrôle de rongeurs,
- Risques écotoxicologiques pour la faune non cible, dont le Busard de Maillard,
- Pistes parfois proposées sur l'utilisation d'autres substances actives rodenticides,
- Perspectives proposées :
 - Définition d'un plan de lutte intégrée à l'échelle de l'île
 - Initier les modifications réglementaires nécessaires au contrôle des populations de rats et souris dans le contexte agricole des territoires d'outre-mer.

Ces études sont, à notre connaissance, les premières à s'intéresser à l'exposition aux rodenticides du Busard de Maillard et plus généralement de la faune sauvage sur l'île de la Réunion. Réalisées avec des contraintes budgétaires importantes, elles ont cependant réussi à mettre en évidence différents éléments, comme la nécessité de considérer « exposition aux rodenticides des espèces non cibles, risque écotoxicologique et résistance des espèces cibles ».

Alors que les enjeux agro-économiques, sanitaires et environnementaux de l'île de la Réunion nécessitent de contrôler efficacement les populations de rongeurs, les travaux présentés dans ce rapport ont permis d'identifier des difficultés certaines à venir. Celles-ci sont présentées ci-dessous. Des éléments qui permettraient de mieux y répondre sont également proposés.

1 EFFICACITE DES OPERATIONS DE CONTROLE DE RONGEURS

Au regard des mutations retrouvées dans la population de souris échantillonnées (17/30 soit 57% porteuses de la mutation Y139C connue pour conférer une forte résistance aux AVKs dont, notamment, les molécules de seconde génération telles que bromadiolone et difénacoum), la plupart des traitements rodenticides sur cette espèce pourraient s'avérer à l'avenir très peu efficaces tout en augmentant le risque d'exposition des espèces non cibles. Nous ne disposons cependant actuellement pas de données suffisantes pour caractériser le risque de sélection de souches résistantes pour les espèces Rat surmulot et Rat noir. Quelle que soit l'espèce de rongeurs considérée, une diminution de l'efficacité des traitements pourrait être très dommageable, que ce soit en matière de gestion sanitaire (zoonoses transmises par les rongeurs), agro-économique (dégâts aux cultures) et écotoxicologique (transfert des substances actives aux espèces non cibles).

Afin de maintenir une efficacité des opérations de contrôle des populations de rongeurs sur l'île, il apparaît nécessaire de pouvoir caractériser au mieux ce phénomène de résistance sur souris, mais également sur rats. Ceci ne pourra se faire sans la mise en œuvre d'un diagnostic à large échelle impliquant différents contextes (ex. agricoles, urbains et milieux naturels) nécessitant l'élaboration d'un protocole d'étude dédié à cette question spécifique.

2 RISQUES ECOTOXICOLOGIQUES POUR LA FAUNE NON CIBLE, DONT LE BUSARD DE MAILLARD

Quatre-vingt treize pour-cent des Busards de Maillard morts en centre de soin ou retrouvés morts en nature ont été exposés au minimum à une substance active rodenticide AVK et 62% présentent des résidus hépatiques supérieurs au seuil reconnu par plusieurs auteurs comme potentiellement létal (> 100 ng/g). Les analyses réalisées sur animaux vivants sont également sans équivoque, puisque 33% des busards accueillis vivants en centre de soin et 78% des individus prélevés en nature sont également exposés aux rodenticides AVKs. Alors que la détection de souches de souris résistantes sur l'île suggère la nécessité d'utiliser les substances actives les plus toxiques, l'exposition réelle et fréquente du Busard de Maillard

aux rodenticides AVKs nécessiterait au contraire de les proscrire et d'utiliser des substances actives le moins rémanentes.

Ces différents points conduisent à considérer l'empoisonnement par les rodenticides AVKs utilisés en milieu agricole, mais très probablement également urbain, comme une menace majeure pour le Busard de Maillard. Des mesures d'atténuation doivent être définies et prises en urgence pour assurer sa conservation.

3 PISTES PARFOIS PROPOSEES SUR L'UTILISATION D'AUTRES SUBSTANCES ACTIVES RODENTICIDES

Il a parfois été proposé d'utiliser d'autres substances actives rodenticides que celles habituellement utilisées. Il peut s'agir par exemple du phosphore de zinc, de la diphacinone ou du cholécalciférol (vitamine D3) combiné avec un AVK. Les principaux éléments de ces substances actives en relation avec la problématique sont présentés ci-dessous. Ces solutions ont pour la plupart été abandonnées il y a quelques dizaines d'années par manque d'efficacité et/ou du fait d'un trop grand risque pour la faune non cible ou pour l'Homme (exposition primaire notamment). **Par conséquent, nous attirons l'attention sur le fait qu'une analyse bibliographique plus approfondie devrait être réalisée avant d'apporter toute conclusion.**

Le phosphore de zinc ou le cholécalciférol pourraient présenter un intérêt pour contrôler des populations de rongeurs résistants aux AVKs (mode d'action différent). Si la toxicité secondaire apparaît faible pour le phosphore de zinc, le risque de toxicité primaire (consommation d'appâts par les espèces non cibles, y compris l'Homme) est très élevé selon plusieurs études écotoxicologiques (ex. Erikson et Urban 2004 : 2 à 3 fois plus élevé que dans le cadre d'AVKs tels que la bromadiolone). Dans le contexte réunionnais de traitements notamment agricoles ou en dehors de bâtiments, la consommation d'appâts par des espèces non cibles, y compris dans des boîtes d'appâtage, est tout à fait probable. Le risque d'exposition primaire d'espèces non cible devrait, de ce fait, ne pas être négligé. De même, cette substance active a montré pour certaines études conduites entre 1942 et 2000, y compris en canne à sucre, une très faible efficacité sur Rat surmulot et sur Rat noir (ex. Eismann *et al.* 2003).

Le cholécalciférol est considéré comme pro-hormone et, par conséquent, répond aux critères d'exclusion de l'article 5(1)(d) du règlement (UE) N° 528/2012 en présentant des propriétés de perturbateur endocrinien tel que défini par le règlement (UE) N° 2017/2100. Son utilisation en extérieur, notamment du fait de concentrations en substance active très élevée dans les appâts (ex. 750 mg/kg) ne pourra se faire sans cette considération. De même, il semblerait que les appâts à base de cholecalciferol présentent une appétence limitée sur Rat surmulot. Il n'est donc pas exclu que ceci se vérifie également sur le Rat noir réputé très néophobe.

La diphacinone, AVK de première génération, conserve un mode d'action anticoagulant anti vitamine K et reste très peu efficace sur souche résistante. Si une diminution des résidus disponibles pour les prédateurs dans les tissus des espèces cibles pourrait être opportun au regard des risques écotoxicologiques identifiés pour le busard, l'utilisation de cette substance active risque de contribuer fortement à la sélection de souches de rongeurs résistantes.

Quelque soit la substance active proposée, il ne semble donc pas exister de solution idéale. Aucune d'elle ne devra être adoptée sans considérer l'ensemble de éléments relatifs à son efficacité et à son écotoxicité.

4 PERSPECTIVES PROPOSEES

4.1 Définition d'un plan de lutte intégrée à l'échelle de l'île

Pour l'ensemble des raisons présentées dans ce rapport et rappelées brièvement ci-dessus, il apparaît nécessaire de réfléchir rapidement et de manière globale à un protocole intégré de contrôle des populations de rongeurs à l'échelle de l'île. Ceci devra se faire aussi bien en milieu urbain, en milieu agricole ou en contexte d'habitats naturels, dans un objectif de conserver une efficacité de contrôle des populations de rongeurs suffisante tout en diminuant activement le risque d'intoxication de la faune non cible. Ces éléments ne pourront être suffisamment définis sans la mise en œuvre de travaux de recherche visant à :

1. **Identifier plus précisément les contextes qui nécessitent la mise en œuvre d'opérations de contrôle des populations de rongeurs** sur la base des enjeux agro-économiques, sanitaires et environnementaux ainsi que les principales causes de présence de ces rongeurs (variations spatiales et temporelles des densités de rongeurs, habitats favorables, rôle de la prédation, dispersions spatiales, recolonisation, abondance de ressources alimentaires etc.) que ce soit en milieu agricole, en milieu urbain ou en milieu naturel.
2. **Identifier à l'échelle de l'île les souches de rongeurs présentant une mutation susceptible de conférer une résistance aux substances actives rodenticides AVKS** ainsi que les contextes associés à la sélection de ces souches aussi bien sur souris que sur Rat noir et Rat surmulot.
3. **Définir les situations les plus à risque en terme d'exposition du Busard de Maillard aux rodenticides** (modalités de contrôle des rongeurs, habitats les plus à risque pour l'espèce en fonction de sa biologie, de sa démographie etc.).
4. **Adapter les mesures de contrôle de populations de rongeurs** sur la base des éléments identifiés précédemment.

La finalité de ces travaux pourra être, par exemple, de proposer un plan de lutte intégrée contre les rongeurs compatible avec la conservation du Busard de Maillard et la biodiversité en général. Ceci ne pourra se faire qu'en partenariat avec les utilisateurs de rodenticides (agriculteurs, professionnels de la dératisation, particuliers) et les organismes de réglementation. Buckle et Prescott (2018) ont récemment examiné les principes généraux d'atténuation des risques pour les rodenticides. Il apparaît essentiel de collaborer avec les agriculteurs pour atténuer les effets non intentionnels des rodenticides en combinant, par exemple, des éléments de lutte mécaniques, biologiques et chimiques. De tels plans de lutte intégrée devraient s'appuyer sur des suivis de population de rongeurs. Ces suivis comprennent

- Des estimations de la densité,
- Des recherches sur la résistance génétique aux substances actives utilisées,
- Des évaluations des dommages causés aux cultures par les rongeurs dans l'espace et le temps,
- Une évaluation du risque de transfert de pathogènes entre rongeurs, faune sauvage, faune domestique et Homme.

Les expériences combinées notamment de plusieurs partenaires du présent projet (Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR 6249 CNRS-UFC Chrono Environnement, VetAgro Sup Lyon - USC 1233 Rongeurs sauvages ainsi que le personnel de Faune INNOV') ont conduit, avec succès, à l'élaboration d'un plan de lutte intégrée pour le Campagnol terrestre en France métropolitaine (ex. Coeurdassier *et al.*, 2014). Faune INNOV' travaille également activement avec plusieurs grandes métropoles européennes à la mise en œuvre de plans de lutte intégrée pour les rats et souris en milieu urbain. Fort de ces expériences, des mesures d'atténuation des risques pour les rodenticides pourraient être mises en œuvre aussi bien dans les zones agricoles, les zones urbaines et les habitats moins anthropisés (ex. préservations d'oiseaux sensibles à la prédation par les rongeurs) où les busards présentent des densités élevées. La sensibilisation des particuliers qui vivent dans des zones critiques pour le busard devrait également permettre de prévenir une utilisation élevée de rodenticides dans les jardins et les zones périurbaines. Des actions récentes ont été entreprises par le SEOR pour informer en ce sens le grand public et promouvoir les méthodes mécaniques (piégeage). Dans un contexte de risque sanitaire accru (leptospirose et autres zoonoses), d'habitats extrêmement favorables aux rongeurs, mais également de ressources alimentaires très importantes, ces méthodes se doivent cependant d'être efficaces et validées pour le contexte réunionnais avant d'être proposées à large échelle.

Pour l'ensemble de ces raisons, il nous semble indispensable de définir un projet collaboratif multi partenaire (enjeux écotoxicologiques espèces non cibles / résistance espèces cibles / efficacité des méthodes de contrôle / enjeux sanitaires et lutte contre les zoonoses / méthodes alternatives de contrôle des populations de rongeurs) dans lequel chacun serait impliqué dès la rédaction du projet, la définition des protocoles ainsi que les réflexions budgétaires nécessaires à la mise en œuvre des études. L'objectif sera alors de rechercher des méthodes alternatives fondées sur des rodenticides plus sûrs et/ou des solutions non chimiques tel que recommandé par Witmer (2018 *Perspectives on existing and potential new alternatives to anticoagulant rodenticides and the implications for integrated pest management*).

4.2 Initier les modifications réglementaires nécessaires au contrôle des populations de rats et souris dans le contexte agricole des territoires d'outre-mer

Au cours de notre étude, il est apparu à l'échelle de l'île qu'une grande partie des traitements rodenticides était réalisée en plein champ pour contrôler le risque de transmission de zoonoses à l'Homme (leptospirose) avec des appâts mis sur le marché en tant que biocides (règlement UE n° 528/2012 du parlement européen et du conseil du 22 mai 2012, concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides). Dans ce cadre, les instances réglementaires européennes recommandent d'effectuer les traitements « dans et autour des bâtiments et infrastructures » dans des boîtes d'appâtages sécurisées. La distribution d'appâts en plein champ sans protection particulière telle que pratiquée actuellement par la profession agricole sur l'île, est de ce fait en dehors du cadre de cette réglementation dite « biocide ». Elle s'apparente plus à une utilisation dite

« phytosanitaire » (protection des cultures). Cependant, que ce soit pour une utilisation biocide ou phytosanitaire, à notre connaissance, aucun usage rats / souris en plein champ n'est homologué en Europe.

En France, la réglementation actuelle en matière de contrôle des rongeurs pour la protection des cultures se concentre sur les cas métropolitains. Ainsi, aucune réglementation ne permet de traitements phytosanitaires à l'encontre des rats et souris et seule l'utilisation d'appâts blés à base de bromadiolone est autorisée et est efficace contre les campagnols (Journal Officiel, 2014). L'utilisation d'appâts à base de phosphore de zinc, si elle est autorisée depuis 2017, ne semble pas être satisfaisante du point de vue efficacité sur toutes les espèces.

Le contexte agronomique et écologique des territoires d'outre-mer devrait être pris en compte par les autorités et défini réglementairement. Cela apparaît comme essentiel afin de proposer des solutions adaptées aux agriculteurs qui sont également acceptables sur le plan environnemental.

Au regard de risques écotoxicologiques importants, il apparaît primordial d'envisager une régularisation des pratiques de contrôle des populations de rongeurs à l'échelle de l'île. Ceci devra être mené conjointement aux réflexions relatives à la problématique - résistance / efficacité / écotoxicité - énoncée précédemment.

L'élaboration d'un plan de lutte intégrée tel que présenté ci-dessus permettra de clarifier la gestion des pratiques de lutte contre les rongeurs. Ces travaux permettront d'apporter des éléments concrets nécessaires à la définition réglementaire de méthodes adaptées pour limiter les impacts sanitaires (transfert de zoonoses) ainsi que les dommages causés par les rats et les souris en milieu agricole sur l'île de la Réunion (canne à sucre et autres cultures) mais également plus généralement dans les territoires d'outre-mer.

Références citées

- Atterby, H., Kelly, M.J. & MacNicoll, A.D. 1999. Difenacoum resistance in rats is not a consequence of increased metabolism and excretion. Second European Vertebrate Pest Management Conference. Braunschweig, Germany.
- Baddeley, A., Rubak, E. & Turner, R. 2016. Spatial Point Patterns: Methodology and Applications With R. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Barré, N., Barau, A. & Jouanin, C. 1996. Oiseaux de La Réunion. Édition du Pacifique, Paris. 207 p.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. J. Stat. Softw. 67, 1–48.
- Berny, P. 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 30, 93-100.
- BirdLife International. 2016. *Circus maillardi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22728310A94979400.
- Booth, L.H., Fisher, P., Heppelthwaite, V. & Eason, C.T. 2003. Toxicity and residues of brodifacoum in snails and earthworms. DOC Science Internal Series 143. Department of Conservation, Wellington, New Zealand. 14 pp.
- Boyle, C. 1960. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. Nature.188, 517-525.
- Brakes, C. & Smith, R. 2005. Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. Journal of Applied Ecology. 42, 118-128.
- Bretagnolle, V., Thiollay, J.M. & Attié, C. 2000a. Status of Reunion Marsh Harrier *Circus maillardi* on Reunion Island. Chancellor, R.D. & B.U. Meyburg (eds). Raptors at risk. World Working Group on Birds of Prey and Owls, Berlin, and Hancock House, Blaine, WA U.S.A. p. 669-676.
- Bretagnolle, V., Ghestemme, T., Thiollay, J.M. & Attié, C. 2000b. Distribution, population size and notes on the Reunion Marsh Harrier, *Circus maillardi*. Journal of Raptor Research 34 (1): 8-17.
- Buckle, A. & Prescott, C. 2018. Anticoagulants and risk mitigation. In: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), Anticoagulant Rodenticides and Wildlife. Springer International Publishing, Cham, pp. 319–355.
- Buckle, A.P. & Smith, R.H. 2015. Rodent Pests and Their Control, 2nd edition. CAB, Wallingford.
- Cheke, A. 1987. The ecology and distribution of native land birds of Reunion. Reunion Harrier (*Circus maillardi*) Verreaux. In Diamond A.W. Edition Studies of Mascarene island birds. Cambridge University Press, p. 311-314.
- Christensen, T.K., Lassen, P. & Elmeros, M. 2012. High exposure rates of anticoagulant rodenticides in predatory bird species in intensively managed landscapes in Denmark. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 63, 437–444.
- CIRAD 2018. Carte d'Occupation du Sol 2016–2017. CIRAD, La Réunion.
- CIRE Océan Indien. 2016. « Surveillance de la leptospirose à La Réunion. Point épidémiologique au 11 février 2016. www.ars.ocean-indien.sante.fr/.../leptospirose/12_2016_PE_lepto_Reunion.pdf ».
- Clark, P.J. & Evans, F.C. 1954. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. Ecology 35, 445–453.

- Coeurdassier, M., Riols, R., Decors, A., Mionnet, A., David, F., Quintaine, T., Truchetet, D., Scheiffler, R. & Giraudoux, P. 2014. Unintentional wildlife poisoning and proposals for sustainable management of rodents. *Conserv. Biol.* 28, 315–321.
- Coeurdassier, M., Poirson, C., Paul, JP., Rieffel, D., Michelat, D., Reymond, D., *et al.* 2012. The diet of migrant Red Kites *Milvus milvus* during a Water Vole *Arvicola terrestris* outbreak in eastern France and the associated risk of secondary poisoning by the rodenticide bromadiolone. *IBIS*, 154, 136-146.
- Comité Français de l'IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) <http://uicn.fr/> consulté en mars 2017.
- Cox, P. & Smith, R.H. 1992. Rodenticide ecotoxicology: Pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. In: Borrecco JE, Marsh RE, editors. *Proceedings of the 15th Vertebrate Pest Conference*. University of Nebraska; Lincoln: Printed at Univ. of California.
- Defrance, H. 2014. Thèse vétérinaire. Etude de la résistance aux anticoagulants chez le rat brun (*Rattus norvegicus*) : Conséquences de l'emploi d'un rodenticide de seconde génération sur la Bromadiolone et l'évolution de la résistance. Eude dans deux fermes de Rhône-Alpes. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.
- Drake, D.R. & Hunt, T.L. 2009. Invasive rodents on islands: integrating historical and contemporary ecology. *Biological Invasions* 11: 1483–1487.
- Dray, S., Dufour, A.B. & Thioulouse, J. 2018. R Package ade4: Analysis of Ecological Data: Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences. Version 1.7–13.
- Eason, C.T. & Spurr, E.B. 1995. Review of the toxicity and impacts of brodifacoum on non-target wildlife in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* 22(4): 371-379.
- Eason, C.T., Murphy, E.C., Wright, G.R.G. & Spurr, E.B. 2002. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zeland. *Ecotoxicology*. 11, 35-48.
- ECHA. 2017. European Chemical Agency, Information on chemicals. <https://echa.europa.eu> consulté en mars 2017
- Eisemann, J., Petersen, B. & Fagerstone, K. 2003. Efficacy of zinc phosphide for controlling Norway rats, Roof rats, House mice, *Peromyscus* spp., Prairie dogs and Ground squirrels: a literature review (1942-2000). *USDA National Wildlife Research Center - Staff Publications*. 212. https://digitalcommons.unl.edu/icwdm_usdanwrc/212
- Elmeros, M., Christensen, T.K. & Lassen, P. 2011. Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats *Mustela erminea* and weasels *Mustela nivalis* from Denmark. *Science of the Total Environment*, Volume 409, Issue 12, 2373-2378.
- Erickson, W. & Urban, D. 2002. Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mammals: a Comparative Approach. Vol. 1. United States Environmental Protection Agency, Washington DC., pp. 198 pp.
- Erickson, W.A. & Urban, D.J. 2004. Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Non Target Mammals: A Comparative Approach. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington.
- European Commission. 2000. Guidance Document on Persistence in Soil; Working Document. Directorate General for Agriculture.
- European Commission. 2002. Guidance document on risk assessment for birds an mammals under council directive 91/414/EEC - Working document. Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, 44pp. + appendix.
- Fisher, P., O'Connor, C., Wright, G. & Eason, C.T. 2003. Persistence of four anticoagulant rodenticides in the livers of laboratory rats DOC SCIENCE INTERNAL SERIES 139. Department of Conservation. New Zealand. 18pp.

- Fourrel, I., Hugnet, C., Goy-Thollot, I. & Berny, P. 2010. Validation of a New Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Ion-Trap Technique for the Simultaneous Determination of Thirteen Anticoagulant Rodenticides, Drugs, or Natural Products. *Journal of Analytical Toxicology*, vol.34.
- Fourrel, I., Damin-Pernik, M., Benoit, E. & Lattard, V. 2016. Core-shell LC-MS/MS method for quantification of second generation anticoagulant rodenticides diastereoisomers in rat liver in relationship with exposure of wild rats. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 1041-1042:120-132
- Fournier-Chambrillon, C., Berny, P., Coiffier, O., Barbedienne, P., Dassé, B., Delas, G., Galineau, H., *et al.* 2004. Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implication for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *Journal of Wildlife Diseases*. 40, 688-695.
- Geduhn, A., Esther, A., Schenke, D., Mattes, H. & Jacob, J. 2014. Spatial and temporal exposure patterns in non-target small mammals during brodifacoum rat control. *Sci. Total Environ.* 496, 328–338.
- Giraudoux, P., Tremolières, C., Barbier, B., Defaut, R., Rieffel, D., Bernard, N., Lucot, E., *et al.* 2006. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environmental Research*. 102, 291-298.
- Godfrey, M.E.R. 1985. Non-target and secondary poisoning hazards of second generation anticoagulants. *Acta Zoologica Fennica* 173: 209–212.
- Gonin, J. 2001. Le « Papangue », un endémique rare et méconnu. Rapport de BTS Gestion et Protection de la Nature, Programme de recherches des Oiseaux terrestres de La Réunion SEOR. 38 p.
- Grandemange, A., Lasseur, R., Longin - Sauvageon, C., Benoit, E. & Berny, P. 2010. Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manag Sci* 66(3): 270-6.
- Greaves, J.H., Sheperd D.S. & Quay, R. 1982. Field trials of second generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations. *J.Hyg.* 89 :295-301.
- Grolleau, G., Lorgue, G. & Nahas, K. 1989. Toxicité secondaire, en laboratoire, d'un rodenticide anticoagulant (bromadiolone) pour des prédateurs de rongeurs champêtres: Buse variable (*Buteo buteo*) et Hermine (*Mustela erminea*). *Bulletin OEPP/EPPO*. 19, 633-648.
- Grolier, B. & Soufflet, O. 2011. Dossier spécial: Lutter contre les ravageurs. *Caro Canne* 25, 8–15.
- Grondin, V. & Philippe, J.S. 2011. Plan de conservation du Busard de Maillard (*Circus maillardi*). SEOR et BIOTOPE pour la DEAL, la Région Réunion, Aérowatt et la Ville de l'Étang-Salé, 81p. (et atlas cartographique). http://www.reunion.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/PDC_Papangue_cle79cef6.pdf.
- Guernier, V., Lagadec, E., Cordonin, C., Le Minter, G., Gomard, Y., Pagès, F., Jaffar-Bandjee, M.-C., Michault, A., Tortosa, P. & Dellagi, K. 2016. Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: are rodents the (only) ones to blame? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004733.
- Health and Safety Executive. 2012. Environmental Risk Mitigation Measures for Second Generation Anticoagulant Rodenticides proposed by the UK - Stakeholder engagement. United Kingdom Government.
- Hindmarch, S. & Elliot, J.E. 2018. Ecological factors driving uptake of anticoagulant rodenticides in predators. In: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A.

- (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Springer International Publishing, Cham, pp. 229–258.
- Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.* 50, 346–363.
- Howald, GR., Ross, J. & Buckle, AP. 2015. Rodent control and island conservation. In: Buckle AP., Smith RG. (eds) *Rodent pest and their control*, 2nd edn. CPI Group Ltd, Croydon, pp 366-398
- Institut Pasteur 2018. Rapport annuel d'activité, Centre national de référence de la leptospirose, année d'exercice 2017. Responsables : Mathieu Picardeau, Pascale Bourhy. 121pp.
- International Union for the Conservation of Nature. 2018. Red List of Threatened Species. Version 2018-1.
- Jacob, J. & Buckle, A. 2018. Use of anticoagulant rodenticides in different applications around the world. In: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Springer International Publishing, Cham, pp. 11–43.
- Jaquot, M. 2013. Usage des rodenticides anticoagulants et conséquences en termes d'exposition et d'impact pour les populations de renard roux. Thèse d'université. Université de Franch-Comté. 186pp.
- Johnson, R.A. 1988. Performance studies with the new anticoagulant rodenticide, flocoumafen, against *Mus domesticus* and *Rattus norvegicus*. *Eur. Plant Protect. Org. Bull.* 18: 481-488.
- Jones, K.C., Alcock, R.E., Johnson, D.L., Nothcott, G.L., Semple, K.T. & Woolgar, P.J. 1996. Organic chemicals in contaminated land: analysis significance and research priorities. *Land Contamination and Reclamation.* 3, 189-197.
- Journal Officiel. 2014. Arrêté du 14 mai 2014 Relatif au Contrôle des Populations de Campagnols Nuisibles aux Cultures ainsi qu'aux Conditions d'Emploi des Produits Phytopharmaceutiques contenant de la Bromadiolone. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000029039908&categorieLien=id>.
- Kemikalieinspektionen, S.C.I. 2006. Competent authority report according to directive 98/8/EC Bromadiolone Cas 28772-56-7; Sweden.
- Kolf-Clauw, M., Alvarez, E. & Matray, O. 1995. Anticoagulant rodenticides : étiologie, diagnostic et traitement des intoxications. *Recueil de Medecine Vétérinaire. Spécial toxicologie des carnivores domestiques*, 127-134.
- Lambert, O., Pouliquen, H., Larhantec, M., Thorin, C. & L'Hostis, M. 2007. Exposure of raptors and waterbirds to anticoagulant rodenticides (difenacoum, bromadiolone, coumatetralyl, coumafen, brodifacoum): Epidemiological survey in loire atlantique (France). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 79, 91-94.
- Le Bonniec, B. 2004. La cible de la warfarine identifiée. *M/S : Médecine Science* 20, 512-514.
- Llyod, B. & Hackwell, K. 1993. A trial to determine whether kaka consume carrot baits Kapiti Island. *Science and Research Series* 62. Department of Conservation, Wellington, New Zealand. 14 pp.
- López-Perea, J.J. & Mateo, R. 2018. Secondary exposure to anticoagulant rodenticides and effects on predators. In: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Springer International Publishing, Cham, pp. 159–193.

- López-Perea, J.J. & Mateo, R. 2019. Urbanization and cattle density are determinants in the exposure to anticoagulant rodenticides of non-target wildlife. *Environ. Pollut.* 244, 201–208.
- Macdonald, I.A.W., Thébaud, C., Strahm, W.A. & Strasberg, D. 1991. Effects of alien plants invasions on native vegetation remnants on La Réunion (Mascarene Islands, Indian Ocean). *Environmental Conservation* 18(1): 51-61.
- MacNicoll, A.D. & Gill, J.E. 1987. The occurrence and significance of rodenticide resistance in UK, pp. 85-95 in *British Crop Protection Council Monograph, No.37*. British Crop Protection Council, Thornton Heath, UK.
- Maillard, L. 1963. Notes sur l'île de La Réunion (Bourbon). Volume 1. Paris. p. 159-162.
- Mailloux, A. 1980. Human leptospiroses in the overseas departments and territories: 10 years' immunological diagnosis (1970–1979). *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, 73, 229–238.
- Mansuy, A., & Fontaine, R. 2014. Fiche phytosanitaire – Canne à sucre – île de la Réunion. *ECOPHYTO Réduire et améliorer l'utilisation des phytos*.
- Martinez-Padilla, J., López-Idiáquez, D., López-Perea, J.J., Mateo, R., Paz, A. & Viñuela, J. 2017. A negative association between bromadiolone exposure and nestling body condition in common kestrels: management implications for vole outbreaks. *Pest Management Science*. 73(2):364-370
- McDonald, R.A., Harris, S., Turnbull, G., Brown, P. & Fletcher, M. 1998. Anticoagulant rodenticides in stoats (*Mustela erminea*) and weasels (*Mustela nivalis*) in England. *Environmental Pollution*. 103, 17-23.
- Merson, M.H., Byers, R.E. & Kaukeinen, D.E. 1984. Residues of the rodenticide brodifacoum in voles and raptors after orchard treatment. *Journal of Wildlife Management* 48 (1), 212-216.
- Moncorps, S., Kirchner, F., Merceron, E. & Rio, S. 2010. La Liste rouge des espèces menacées en France. Premiers résultats de la Liste rouge nationale en outre-mer : la faune de La Réunion hautement menacée. Dossier de presse.
- Morgan, D.R., Wright, G.R., Ogilvie, S.C., Pierce, R. & Thomson, P. 1996 Assessment of the environmental impact of brodifacoum during rodent eradication operations in New Zealand. In: Booth, L.H., Eason, C.T. & Spurr, E.B. (2001) Literature review of the acute toxicity and persistence of brodifacoum to invertebrates. Pp. 1-9.
- Montaz, J. 2013. Evaluation de la persistance des rodenticides anticoagulants dans le sang d'oiseaux et mise au point d'un protocole de surveillance de l'exposition du Milan royal à des substances toxiques. Master d'écologie appliquée. Université de Franche Comté. 32pp.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Newton, I., Shore, R.F., Wyllie, I., Birks, J.D.S., Dale, L. 1999. Empirical evidence of sideeffects of rodenticides on some predatory birds and mammals. In: Cowan, P., Feare, C. (Eds.), *Advances in Vertebrate Pest Management*. Filander Verlag, Fürth, pp. 347–367.
- Notman, P. 1989. A review of invertebrate poisoning by compound 1080. *New Zealand Entomologist*. Vol. 12, pp. 67-71.
- Ogilvie, S.C., Pierce, R.J., Wright, G.R.G., Booth, L.H. & Eason, C.T. 1997 Brodifacoum residue analysis in water, soil, invertebrates, and birds after rat eradication on Lady Alice Island. *New Zealand Journal of Ecology*. Vol. 21, pp. 195-197.

- Pagès, F., Polycarpe, D., Dehecq, J.S., Picardeau, M., Caillère, N., Jaffar-Bandjee, M.C., Michault, A. & Filleul, L. 2014. Human Leptospirosis on Reunion Island: Past and Current Burden. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (1): 968-982. doi:10.3390/ijerph110100968.
- Pelz, H.J., Rost, S., Müller, E., Esther, A., Ulrich, E.G. & Müller, C.L. 2011. Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Management Science* 68: 254-259.
- Pertuiset, E., Fen Chong, M., Duval, G. & Genin, R. 1988. Clinical aspects and prognostic factors of icterohemorrhagic leptospirosis in adults. Apropos of 249 cases in La Reunion. *Rev. Med. Interne*. 9, 487–493.
- Pierce, R.J. & Montgomery, P.J. 1992. The fate of birds and selected invertebrates during a 1080 operation. Science and Research Internal Report 121. Department of conservation, Wellington, New Zealand. 17 pp.
- Poché, R.M. 1988. Rodent tissue residue and secondary hazard studies with Bromadiolone. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 323-330.
- R Core Team 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rattner, B.A., Horak, K.E., Warner, S.E., Day, D.D., Meteyer, U., Volker, S.F., Eisemann, J.D. & Johnston, J.J. 2011. Acute toxicity, histopathology and coagulopathy in American Kestrels (*Falco sparverius*) following administration of the rodenticide diphacinone. *Environ. Toxicol. Chem.* 30: 1213–1222.
- Rattner, B.A., Lazarus, R.S., Elliott, J.E., Shore, R.F. & van den Brink N. 2014. Adverse Outcome Pathway and Risks of Anticoagulant Rodenticides to Predatory Wildlife. *Environ Sci Technol* 48:8433–8445.
- Record, C.R. & Marsh, R.E. 1988. Rodenticide residues in animal carcasses and their relevance to secondary hazards. In: Crabb AC, Marsh RE, editors. *Proceedings of the 13th Vertebrate Pest Conference*, 163-168.
- Ribeiro, P.J. & Diggle, P.J. 2016. R Package geoR: Analysis of Geostatistical Data. (Version 1.7-5.2).
- Ringler, D. 2013. Ecologie du rat noir (*Rattus rattus*) dans les îles tropicales et impacts sur les oiseaux marins. Thèse d'Université de la Réunion. Faculté des sciences et technologies.
- Ringler, D., Russell, J., Jaeger, A., Pinet, P., Bastien, M. & LeCorre, M. 2014. Invasive rat space use on tropical islands: implications for bait broadcast. *Basic Appl. Ecol.* 15,179–186.
- Rowe, F.P., Plant C.J. & Bradfield. A. 1981. Trials of the anticoagulant rodenticides Bromadiolone and difenacoum against the house mouse (*Mus musculus* L.). *J.Hyg.* 87: 171-177.
- RRAC. 2015. Rodenticide Resistance Action Committee guidelines on Anticoagulant Rodenticide Resistance Management. CropLife International 32pp.
- Ruiz-Suárez, N., Henriquez-Hernandez, L.A., Valerón, P.F., Boada, L.D., Zumbado, M., Camacho, M., Almeida-Gonzalez, M. & Luzardo, O.L. 2014. Assessment of anticoagulant rodenticide exposure in six raptor species from the Canary Islands (Spain). *Science of the Total Environment* 485-486, 371-376.
- Saether, B.E. & Bakke, O. 2000. Avian life history variation and contribution of demographic traits to the population growth rate. *Ecology* 81, 642–653.

- Sage, M., Coeurdassier, M., Defaut, R., Lucot, E., Barbier, B., Rieffel, D., Berny, P., *et al.* 2007. How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*? Environmental Pollution. 148, 372-379.
- Sage, M., Coeurdassier, M., Defaut, R., Gimbert, F., Berny, P. & Giraudoux, P. 2008. Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of the water vole, *Arvicola terrestris*. Science of the total environment. 407, 211-222
- Sage, M., Fourel, I., Coeurdassier, M., Barrat, J., Berny, P. & Girardoux, P. 2010. Determination of Bromadiolone residues in fox faeces by LC/ESI-MS in relationship with toxicological data and clinical signs after repeated exposure. Environmental Research 110: 664-674.
- Santé Publique France. 2019. Leptospirose. Données : données. Mise à jour le 17 juin 2019. Dernière consultation le 24 août 2019. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-prevention-vaccinale/leptospirose/donnees/#tabs>
- Saucy, F., Meylan, A., & Poitry, R. 2001. Lessons from 18 years of use of anticoagulants against fossorial *Arvicola terrestris* in Switzerland. In: Pelz, J., Cowan, P., Feare, C., editors. Advances in vertebrate pest management II. Filander Verlag, Fürth, 71-90.
- Shore, R.F., Birks, J.D.S., Freestone, P., & Kitchener, A.C. 1996. Second-generation rodenticides and polecats (*Mustela putorius*) in Britain. Environmental Pollution. 91 (3), 279-282.
- Shore, R.F., Birks, J.D.S., Afsar, A., Wienburg, C.L., & Kitchener, A.C. 2003. Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. Environmental Pollution. 122, 183-193.
- Shore, R.F., Walker, L.A., Buckle, A.P., Chaplow, J.S., Daniels, L.J., Llewellyn, N.R., Pereira, M.G. & Potter, E.D. 2013. Does resistance to second generation anticoagulant rodenticides (SGARs) in rats increase secondary exposure of predators? In 23rd Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Glasgow.
- Shore, R.F., Pereira, M.G., Potter, E.D. & Walker, L.A. 2015. Monitoring rodenticides residues in wildlife. In: Buckle, A.P., Smith, R.H. (Eds.), Chapter 17 of Rodent Pests and Their Control, second ed. Cabi International.
- Siegmund, B. 2011. Ver blanc, rat, foreur. Lutter contre les ravageurs. Carocanne numéro 25, novembre 2011, 24pp.
- Singleton, G., Belmain, S., Brown, P. & Hardy B. 2010. Rodent Outbreaks: Ecology and Impacts, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines 289 pp
- Sokal, P.R. & Rohlf, F.J. 1997. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Compagny, New York, USA.
- Spurr, E.B. 1994. Impacts on non-target invertebrate populations of aerial application of sodium monofluoroacetate (1080) for brushtail possum control. In: Spurr, E.B. & Drew, K.W. (1999) Invertebrates feeding on baits used for vertebrate pest control in New Zealand. New Zealand Journal of Ecology. Vol. 23, N° 2, pp. 167-173.
- Spurr, E.B. 1996. Environmental effects of rodent Talon® baiting. Part II: Impacts on invertebrate populations. Science for Conservation 38. Department of Conservation, Wellington, New Zealand. Pp. 12-27
- Spurr, E.B., Maitland, M.J., Taylor, G.E., Wright, G.R.G., Radford, C.D. & Brown L.E. 2005. Residues of brodifacoum and other anticoagulant pesticides in target and non-target

- species, Nelson Lakes National Park, New Zealand, New Zealand Journal of Zoology, 32:4, 237-249, DOI: 10.1080/03014223.2005.9518416
- Stone, W.B., Okoniewski, J.C. & Stedelin, J.R. 1999. Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. Journal of Wildlife Diseases. 35, 187-193.
- Thomas, P.J., Mineau, P., Shore, R.F., Champoux, L., Martin, P.A., Wilson, L.K., Fitzgerald, G. & Elliott, J.E. 2011. Second generation anticoagulant rodenticides in predatory birds: probabilistic characterisation of toxic liver concentrations and implications for predatory bird populations in Canada. Environ. Int. 37, 914–920.
- USEPA 1998. Registration Eligibility Decision (RED) Rodenticide Cluster. EPA 738-R-98-007. Environmental Protection Agency, United States.
- Valette, C. 2013. Écologie du Busard de Maillard – Zone d'étude des hauts de la commune de Bras-Panon. Rapport de stage de Master 2 Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux, Université de La Réunion/Société d'Etudes Ornithologiques de La Réunion (SEOR). 24p + annexes.
- Vandenbroucke, V., Bousquet-Melou, A., De Backer, P. & Croubels, S. 2008. Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 31(5):437-45
- Vein, J., Vey, D., Fourel, I. & Berny, P. 2013. Bioaccumulation of chlorophacinone in strains of rats resistant to anticoagulants. Resistant rats may then be a threat for non-target species for prolonged periods of time. Pest Manag Sci. Mar; 69 (3):397-402.
- Whisson, D.A., Quinn, J.H. & Collins, K.C. 2007. Home Range and Movements of Roof Rats (*Rattus rattus*) in an Old-growth Riparian Forest, California. Journal of Mammalogy, 88, 589–594.
- WHO. 1995. Anticoagulant Rodenticides - Environmental Health Criteria 175. In: E. H. C. 175, (Ed.). World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Geneva. 97 pp.
- Widianarko. B. & Van Straalen. N.M. 1996. Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals. Environ. Toxicol. Chem., 15,402-406.
- Witmer, G.W. 2018. Perspectives on existing and potential new alternatives to anticoagulant rodenticides and the implications for integrated pest management. In: van den Brink, N.W., Elliott, J.E., Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), Anticoagulant Rodenticides and Wildlife. Springer International Publishing, Cham, pp. 357–377.
- Wood, S.N. 2017. Generalized Additive Models: An Introduction With R, 2nd edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Wood, S.N. & Scheipl, F. 2017. R Package gamm4: Generalized Additive Mixed Models Using 'mgcv' and 'lme4'. Version 0.2–5.
- Wright, G.R. & Eason, C.T. 1991 Residue analysis of invertebrate samples for brodifacoum (Talon). Forest Research Institute contract report, FWD 91/94, 5 pp. In: Booth, L.H., Eason, C.T. & Spurr, E.B. (2001) Literature review of the acute toxicity and persistence of brodifacoum to invertebrates. Pp. 1-9.