

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 045 040

②1 N° d'enregistrement national : **15 62164**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 07 D 311/56** (2017.01), A 01 N 43/16, A 01 P 11/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 11.12.15.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 16.06.17 Bulletin 17/24.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension : Polynésie-Fr

⑦1 Demandeur(s) : LIPHATECH Société par actions simplifiée — FR et INSTITUT ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET RECHERCHE EN ALIMENTATION SANTE ANIMALE SCIENCES AGRONOMIQUES ET ENVIRONNEMENT (VET AGRO SUP) — FR.

⑦2 Inventeur(s) : CARUEL HERVE, BENOIT ETIENNE, FOUREL ISABELLE et LATTARD VIRGINIE.

⑦3 Titulaire(s) : LIPHATECH Société par actions simplifiée, INSTITUT ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET RECHERCHE EN ALIMENTATION SANTE ANIMALE SCIENCES AGRONOMIQUES ET ENVIRONNEMENT (VET AGRO SUP).

⑦4 Mandataire(s) : CABINET BARRE LAFORGUE & ASSOCIES.

⑤4 STEREO-ISOMERE DE CONFIGURATION DU FLOCOUMAFENE, COMPOSITION ET APPAT RODONTICIDE LE COMPRENANT, PROCEDE DE LUTTE CONTRE DES RONGEURS CIBLES NUISIBLES.

⑤7 L'invention concerne un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₁, du flocoumafène, ledit énantiomère E₁ présentant, par analyse chromatographique du flocoumafène effectuée dans des conditions particulières, un temps de rétention t_i de valeur telle que t₁ < t₂ < t₃ < t₄; t₂, t₃ et t₄ représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E₁, ladite analyse étant réalisée à la température de 23,5°C.

FR 3 045 040 - A1



STÉRÉO-ISOMÈRE DE CONFIGURATION DU FLOCOUMAFÈNE,
COMPOSITION ET APPÂT RODONTICIDE LE COMPRENANT, PROCÉDÉ
DE LUTTE CONTRE DES RONGEURS CIBLES NUISIBLES

L'invention concerne un stéréo-isomère de configuration du
5 flocoumafène, une composition et un appât rodenticide comprenant un tel
stéréo-isomère de configuration et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles
nuisibles. L'invention concerne aussi un procédé d'obtention d'un tel
stéréo-isomère de configuration du flocoumafène. L'invention concerne donc le
domaine technique de la lutte contre des populations de rongeurs cibles nuisibles.

10 Il est connu d'utiliser des poisons sous forme d'appâts
rodenticides contre des rongeurs cibles nuisibles. On connaît de
WO2005/072524 un appât rodenticide comprenant une proportion de
flocoumafène de 50 ppm dans l'appât et une proportion de fipronil de 40 ppm.

Un tel appât est susceptible d'être consommé par des
15 animaux autres que des rongeurs cibles nuisibles lorsqu'il est mis à la disposition
de rongeurs cibles nuisibles. Il peut être consommé directement (consommation
primaire) par des animaux domestiques ou des animaux de compagnie. Il peut
aussi être consommé accidentellement par des humains. Une telle consommation
peut produire chez ces animaux domestiques, chez ces animaux de compagnie ou
20 chez des humains un empoisonnement qui peut être léthal.

En outre, une fraction du flocoumafène de ces appâts
rodenticides peut être ingérée (consommation secondaire) par des animaux
-notamment par des oiseaux- prédateurs ou charognards de rongeurs nuisibles et
notamment de rongeurs cibles nuisibles affaiblis ayant consommé un tel appât
25 rodenticide. Cette consommation secondaire est susceptible d'entraîner à terme
la mort par intoxication secondaire de ces animaux prédateurs ou charognards qui
peuvent être des animaux -notamment des oiseaux- appartenant à des espèces
protégées.

L'invention vise donc à pallier ces inconvénients en
30 proposant un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, une composition
et un appât rodenticide comprenant un tel stéréo-isomère de configuration et un

procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui sont en même temps efficaces pour contrôler les populations de rongeurs cibles nuisibles et qui permettent aussi de limiter les risques d'empoisonnement d'animaux non-cibles -notamment des animaux domestiques ou d'élevage, des animaux de compagnie
5 ou des humains- consommant accidentellement un tel appât rodenticide.

L'invention vise donc à pallier ces inconvénients en proposant un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, une composition et un appât rodenticide comprenant un tel stéréo-isomère de configuration et un
10 procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui sont en même temps efficaces pour contrôler les populations de rongeurs cibles nuisibles et qui permettent aussi de limiter les risques d'empoisonnement secondaire d'animaux -par exemple de renards ou d'oiseaux- sauvages prédateurs de rongeurs cibles nuisibles affaiblis ayant consommé de l'appât rodenticide ou d'animaux sauvages charognards de rongeurs cibles nuisibles morts empoisonnés.

L'invention vise aussi à proposer un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, une composition et un appât rodenticide comprenant un tel stéréo-isomère de configuration et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui sont respectueux de l'environnement, de la santé humaine et des animaux non cibles -notamment des oiseaux, et en
15 particulier des rapaces-.

L'invention vise aussi à proposer un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, une composition et un appât rodenticide comprenant un tel stéréo-isomère de configuration et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles dont la mise en œuvre est en accord avec les règles
20 de bon usage -notamment vis à vis de la protection des oiseaux, et en particulier des rapaces-.

L'invention vise aussi à proposer un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, une composition et un appât rodenticide comprenant un tel stéréo-isomère de configuration et un procédé de lutte contre
30 des rongeurs cibles nuisibles qui sont susceptibles de pouvoir être utilisés pour lutter contre des rongeurs cibles nuisibles susceptibles d'être résistants à des

appâts connus de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles.

L'invention vise donc à proposer une alternative à des appâts rodenticides connus.

Pour ce faire, l'invention concerne un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_1 , du flocoumafène, ledit énantiomère E_1 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t_1 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_2 , t_3 et t_4 représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_1 , ladite analyse étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

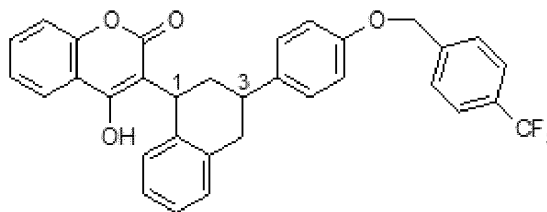
- sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;

- en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;

- par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 μL de composition de flocoumafène à une concentration de 1 μg de flocoumafène par millilitre d'acétonitrile.

Dans tout le texte :

- le terme « flocoumafène » désigne le composé de formule 3-[4-(4-trifluorométhylbenzyloxy)phényl-4-yl]-1-(4-hydroxycoumarin-3-yl)-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène ou 4-hydroxy-3-[1,2,3,4-tétrahydro-3-[4-[[4-(trifluorométhyl)phényl]méthoxy]phényl]-1-naphtalényl]-2H-1-benzopyran-2-one, ou 4-hydroxy-3-[1,2,3,4-tétrahydro-3-[4-(4-trifluorométhylbenzyloxy)phényl]-1-naphtyl]coumarine de formule (I) ci-après :



(I) ;

dans laquelle sont représentés les numéros des carbones 1 et 3 du groupement 1,2,3,4-tétrahydronaphtalène ;

- le terme « stéréo-isomères » désigne des isomères de même formule semi-développée, mais dont la position relative des atomes diffère dans l'espace. L'expression « stéréo-isomères de configuration » désigne les stéréo-isomères dont la conversion de l'un en l'autre de ces stéréo-isomères de configuration nécessite une rupture/reformation d'une liaison covalente interatomique. Ainsi, l'expression « stéréo-isomères de configuration » désigne les stéréo-isomères qui ne sont pas des isomères de conformation (ou « rotamères », dont la conversion de l'un en l'autre des isomères de conformation s'accompagne uniquement d'une rotation d'une partie de la molécule selon l'axe d'une liaison σ (sigma) formée par recouvrement axial d'orbitales) ;

- le terme « quantité » s'entend d'une quantité molaire, d'une quantité massique ou d'une quantité volumique. Les proportions sont donc des proportions d'une quantité molaire rapportée à une quantité molaire, d'une quantité massique rapportée à une quantité massique, ou d'une quantité volumique rapportée à une quantité volumique ;

- le terme « sensiblement » indique, de façon habituelle, qu'une caractéristique structurale ou fonctionnelle ne doit pas être prise comme marquant une discontinuité abrupte, qui n'aurait pas de sens physique, mais couvre non seulement cette structure ou cette fonction, mais également des variations légères de cette structure ou de cette fonction qui produisent, dans le contexte technique considéré, un effet de même nature, sinon de même degré ;

- les expressions « chromatographie liquide à haute pression » ou « chromatographie liquide à haute performance » (« CLHP ») désignent la chromatographie « HPLC » ou « *High Performance Liquid Chromatography* », et ;

- l'expression « temps de rétention » désigne la durée mesurée au sommet du pic de chromatogramme pendant laquelle un composé est retenu sur la colonne de chromatographie.

L'invention concerne donc ledit énantiomère E_1 à l'état isolé et qui présente la propriété de pouvoir être élué, dans les conditions de chromatographie décrites ci-dessus, le premier par rapport aux quatre stéréoisomères de configuration du flocoumafène.

Les inventeurs ont observé que l'analyse du flocoumafène par chromatographie liquide à haute pression dans les conditions décrites ci-dessus fait apparaître quatre signaux ou pics correspondant à quatre composés de même formule chimique développée et correspondant à la formule (I) du flocoumafène. Ils ont déterminé, par l'analyse de préparations de flocoumafène comprenant des proportions variables des deux diastéréoisomères du flocoumafène que :

- le composé correspondant au signal de temps de rétention t_1 d'une valeur de l'ordre de 4,5 min est un énantiomère, dit énantiomère E_1 , de l'un des deux diastéréoisomères, dit diastéréoisomère $D_{1,4}$, du flocoumafène ;

- le composé correspondant au signal de temps de rétention t_4 d'une valeur de l'ordre de 9,3 min est l'autre énantiomère, dit énantiomère E_4 , dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$, distinct dudit énantiomère E_1 ;

- le composé correspondant au signal de temps de rétention t_2 d'une valeur de l'ordre de 6,2 min est un énantiomère, dit énantiomère E_2 , de l'autre diastéréoisomère, dit diastéréoisomère $D_{2,3}$, du flocoumafène, distinct dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$, et ;

- le composé correspondant au signal de temps de rétention t_3 d'une valeur de l'ordre de 6,8 min est l'autre énantiomère, dit énantiomère E_3 , dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$, distinct dudit énantiomère E_2 .

Les valeurs des temps de rétention t_1 , t_2 , t_3 et t_4 sont susceptibles de varier, notamment avec la température de la colonne de chromatographie. Cependant, dans ces conditions chromatographiques, l'ordre d'éluion des énantiomères du flocoumafène reste inchangé.

L'un des deux diastéréoisomères du flocoumafène est un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène dans lequel les carbones 1 et 3 du groupement 1,2,3,4-tétrahydronaphtalène du flocoumafène sont de même configuration absolue et l'autre des deux diastéréoisomères du flocoumafène est un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène dans lequel les carbones 1 et 3 du groupement 1,2,3,4-tétrahydronaphtalène du flocoumafène sont de configurations absolues distinctes, les configurations absolues étant déterminées selon les règles séquentielles de priorité et la nomenclature de Cahn, Ingold et Prelog.

Les inventeurs ont réalisé une telle séparation des stéréo-isomères de configuration, c'est-à-dire des énantiomères des deux diastéréoisomères, du flocoumafène par chromatographie liquide à haute pression sur colonne chirale LUX[®] Cellulose-4 (00F-4490-B0, phenomenex, Le Pecq, France). Le cas échéant, il est possible de réaliser successivement plusieurs étapes de chromatographie liquide à haute pression sur colonne chirale aux fins d'obtenir la quantité dudit énantiomère E₁ recherchée à la pureté souhaitée. Il est aussi possible de réaliser une telle séparation par chromatographie liquide à haute pression sur colonne chirale préparative de plus grandes dimensions -notamment de diamètre intérieur supérieur à 2 mm- et dans laquelle la phase stationnaire présente une granulométrie supérieure à 3 µm. Les inventeurs ont obtenu ledit énantiomère E₁ purifié et séparé de l'énantiomère E₄ dudit diastéréoisomère D_{1,4} du flocoumafène et des énantiomères E₂ et E₃ dudit diastéréoisomère D_{2,3} du flocoumafène par élimination de la phase mobile de la fraction collectée et contenant ledit énantiomère E₁.

Il n'était pas connu antérieurement de méthode pour séparer les énantiomères dudit diastéréoisomère D_{1,4} du flocoumafène. Dans ces conditions expérimentales, les énantiomères (E₁ et E₄) dudit diastéréoisomère D_{1,4} sont efficacement séparés et purifiés par chromatographie liquide à haute pression. Dans ces conditions chromatographiques, on sépare aussi les énantiomères dudit diastéréoisomère D_{2,3} du flocoumafène.

L'invention concerne donc ledit énantiomère E₁ dudit

diastéréoisomère $D_{1,4}$ qui est le moins retenu (de plus faible temps de rétention) des quatre énantiomères des diastéréoisomères du flocoumafène séparés par chromatographie dans les conditions précitées.

L'invention concerne donc ledit énantiomère E_1 séparé de
5 l'énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et séparé de chaque énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$.

L'invention concerne aussi un procédé chromatographique de séparation des stéréo-isomères de configuration -notamment desdits énantiomères E_1 et E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et desdits énantiomères E_2 et
10 E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$. L'invention concerne aussi un procédé chromatographique d'obtention dudit énantiomère E_1 selon l'invention.

L'invention concerne donc un tel procédé chromatographique d'obtention dudit énantiomère E_1 selon l'invention, dans lequel :

15 - on choisit une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;

20 - on choisit, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;

- on réalise une séparation des stéréo-isomères de configuration du
25 flocoumafène à température ambiante lors de laquelle ;

- on introduit en tête de la colonne pour chromatographie une composition liquide comprenant dudit énantiomère E_1 , puis ;

- on entraîne la composition liquide avec la phase mobile dans la colonne pour chromatographie dans des conditions propres à séparer les
30 stéréo-isomères de configuration du flocoumafène, et on collecte une fraction de la phase mobile comprenant ledit énantiomère E_1 avec un temps de rétention t_1 de

valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_2 , t_3 et t_4 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_1 , séparément dudit énantiomère E_4 de temps de rétention t_4 , et ;

5 - on élimine la phase mobile liquide de ladite fraction de façon à obtenir ledit énantiomère E_1 .

L'invention concerne aussi ledit énantiomère E_1 obtenu par un procédé selon l'invention.

10 L'invention concerne aussi une composition comprenant dudit énantiomère E_1 selon l'invention, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_1 et dudit énantiomère E_4 .

L'invention concerne donc une composition comprenant un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_1 , du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_1 et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_4 , du flocoumafène ;

15 - ledit énantiomère E_1 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t_1 ;

20 - ledit énantiomère E_4 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t_4 ;

t_1 et t_4 étant de valeurs telles que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$, t_2 et t_3 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_1 et dudit énantiomère E_4 , ladite analyse étant
25 réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

▪ sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate),
30 lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;

- en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;
- 5 ▪ par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 μ L de composition de flocoumafène à une concentration de 1 μ g de flocoumafène par millilitre d'acétonitrile.

L'invention concerne donc une telle composition comprenant dudit énantiomère E_1 , à l'exclusion d'un mélange racémique dudit
10 énantiomère E_1 et dudit énantiomère E_4 , c'est-à-dire à l'exclusion d'une composition dans laquelle ledit énantiomère E_1 et ledit énantiomère E_4 sont en mélange équimoléculaire et non optiquement actif.

On dose ledit énantiomère E_1 et ledit énantiomère E_4 de toute composition comprenant du flocoumafène par analyse et séparation par
15 chromatographie en utilisant une phase stationnaire chirale et une phase mobile liquide telles que décrites ci-dessus pour l'analyse des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène, en réalisant une détection quantitative des énantiomères des diastéréoisomères du flocoumafène en sortie de colonne séparative, par exemple par photométrie ou spectrophotométrie d'absorption, en
20 ajustant la concentration en flocoumafène et le volume d'injection aux fins d'obtenir une détection optimale et en mesurant la valeur de l'aire sous le pic de chaque énantiomère E_1 et E_4 . Il est aussi possible de doser ledit énantiomère E_1 et ledit énantiomère E_4 de toute composition comprenant du flocoumafène en réalisant une détection par spectrométrie de masse en sortie de colonne
25 séparative.

Avantageusement et selon l'invention, la quantité dudit énantiomère E_1 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_4 dans la composition. Dans la composition ledit diastéréoisomère $D_{1,4}$ est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_1 . La composition selon l'invention comprend
30 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ majoritairement sous forme dudit énantiomère E_1 .

Dans tout le texte, l'expression « ledit diastéréoisomère

énantiomère E_1 et de la quantité dudit énantiomère E_4 présents dans la composition est compris entre 98 % et 100 %.

La composition peut aussi comprendre une quantité dudit énantiomère E_4 telle que le rapport de cette quantité sur la somme de la quantité dudit énantiomère E_1 et de la quantité dudit énantiomère E_4 présents dans la composition est inférieur à 50 %, notamment inférieur à 25 %, préférentiellement compris entre 0 % et 25 %, en particulier inférieur à 10 %.

Avantageusement et selon l'invention, le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_1 dans la composition. La composition comprend donc une quantité dudit énantiomère E_1 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur au rapport de la quantité dudit énantiomère E_4 sur la quantité du flocoumafène dans la composition et supérieur au rapport de la quantité de chaque énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ sur la quantité du flocoumafène dans la composition.

Ainsi, en particulier, dans une composition selon l'invention :

- le rapport de la quantité dudit énantiomère E_1 sur la quantité du flocoumafène est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;
- le rapport de la quantité dudit énantiomère E_1 sur la somme des quantités de chaque énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et des quantités de chaque énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;
- le rapport de la concentration dudit énantiomère E_1 dans la composition sur la concentration du flocoumafène dans la composition est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;
- la proportion dudit énantiomère E_1 dans la composition est supérieure à la proportion de chaque énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ dans la composition et à la proportion dudit énantiomère E_4 dans la composition.

Avantageusement et selon l'invention, la composition

comprend une quantité dudit énantiomère E_1 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur à 25%, notamment supérieur à 50%, en particulier supérieur à 70%, plus particulièrement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90%,
5 particulièrement préférentiellement supérieur à 95%, plus préférentiellement supérieur à 98%, encore plus préférentiellement supérieur à 99% ou de l'ordre de 100%.

Dans un mode particulier de réalisation, avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_1
10 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur à 70 %, de préférence compris entre 80 % et 100 %, plus préférentiellement compris entre 90 % et 100 %.

Dans un autre mode de réalisation, avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_1
15 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est compris entre 95 % et 99 %.

Dans un autre mode de réalisation particulier, avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_1 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du
20 flocoumafène dans la composition est supérieur à 95%.

Dans un autre mode de réalisation, avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_1 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est compris entre 98% et 100 % -bornes incluses-.

Dans un autre mode de réalisation particulièrement avantageux selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_1 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est sensiblement de l'ordre de 100 %.

Une composition selon l'invention peut être sensiblement
30 exempte dudit énantiomère E_4 , c'est à dire que ledit énantiomère E_4 peut éventuellement être présent dans la composition mais seulement à l'état de

Un appât rodenticide selon l'invention comprend :

- au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles, et ;
- un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₁,
5 du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₁ et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₄, du flocoumafène ;
 - ledit énantiomère E₁ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un
10 temps de rétention t₁ ;
 - ledit énantiomère E₄ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t₄ ;
- 15 t₁ et t₄ étant de valeurs telles que t₁ < t₂ < t₃ < t₄, t₂ et t₃ représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄, ladite analyse étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :
 - sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de
20 dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 µm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;
 - en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé
25 d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;
 - par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 µL de composition de flocoumafène à une concentration de 1 µg de flocoumafène
30 par millilitre d'acétonitrile.

Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention

comprend un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles et dudit énantiomère E_1 dans lequel la quantité dudit énantiomère E_1 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_4 . Il peut aussi s'agir d'un appât rodenticide comprenant du flocoumafène et dans lequel le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_1 .

Les inventeurs qui sont parvenus à séparer ledit énantiomère E_1 et ledit énantiomère E_4 et à isoler ledit énantiomère E_1 , ont aussi découvert, de façon totalement surprenante et imprévisible, que :

- la rémanence dudit énantiomère E_1 dans le foie de rongeurs cibles nuisibles femelles ayant consommé un tel appât rodenticide selon l'invention est supérieure à la rémanence dudit énantiomère E_1 dans le foie de rongeurs cibles nuisibles mâles ayant consommé un tel appât rodenticide, et que ;

- la rémanence dudit énantiomère E_1 dans le foie de rongeurs cibles nuisibles femelles est suffisante pour être rodenticide pour les rongeurs cibles nuisibles femelles.

Ils ont aussi constaté qu'il est ainsi possible de contrôler une population de rongeurs cibles nuisibles en visant sélectivement les femelles de rongeurs cibles nuisibles, en limitant le nombre de portées de rongeurs cibles nuisibles.

Ainsi, ledit énantiomère E_1 selon l'invention permet la réalisation d'appâts rodenticides présentant une efficacité rodenticide élevée vis-à-vis de rongeurs cibles nuisibles femelles et permettant de limiter le nombre de portées de rongeurs cibles nuisibles susceptibles d'être engendrées par ces rongeurs cibles nuisibles femelles.

Un tel appât rodenticide permet donc de limiter la quantité de flocoumafène résiduelle dans le foie des rats mâles tout en maintenant dans le foie des rats femelles une quantité de flocoumafène qui est rodenticide pour lesdites femelles de rongeurs cibles nuisibles. Un tel appât rodenticide est donc moins toxique pour l'environnement et, en particulier pour des animaux -notamment pour des oiseaux appartenant à des espèces protégées- prédateurs ou charognards de rongeurs nuisibles et notamment de rongeurs cibles nuisibles

mâles affaiblis ayant consommé un tel appât rodenticide, mais conserve une activité anticoagulante suffisante, en particulier chez les femelles de rongeurs cibles nuisibles, de sorte que l'appât rodenticide permet de contrôler des populations de rongeurs cibles nuisibles.

5 Un appât rodenticide selon l'invention est susceptible de pouvoir être utilisé pour lutter contre des populations de rongeurs cibles nuisibles résistants à des traitements rodenticides connus.

Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention comprend une quantité massique de flocoumafène telle que le rapport de cette
10 quantité massique de flocoumafène sur la quantité massique d'appât rodenticide est inférieur à 200 ppm -c'est-à-dire inférieure à 200 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide-. Avantageusement, il comprend une quantité massique de flocoumafène telle que le rapport de cette quantité massique de flocoumafène sur la quantité massique d'appât rodenticide est supérieur à 1 ppm.

15 Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention comprend une quantité massique de flocoumafène telle que le rapport de cette quantité massique de flocoumafène sur la quantité massique d'appât rodenticide est compris entre 1 ppm et 200 ppm (1 mg à 200 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide). Avantageusement, le rapport de cette quantité massique de
20 flocoumafène sur la quantité massique d'appât rodenticide est compris entre 1 ppm et 100 ppm (1 mg à 100 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide), notamment compris entre 1 ppm et 50 ppm (1 mg à 50 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide), de préférence compris entre 5 ppm et 25 ppm (5 mg à 25 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât
25 rodenticide).

Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention comprend une quantité dudit énantiomère E₁ telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans l'appât rodenticide est supérieur à 70%, plus particulièrement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90%,
30 particulièrement préférentiellement supérieur à 95%, plus préférentiellement supérieur à 98%, encore plus préférentiellement supérieur à 99% ou de l'ordre de

100%, et du flocoumafène en quantité massique dans l'appât rodenticide telle que le rapport de cette quantité massique sur la quantité massique d'appât rodenticide soit inférieur 200 ppm, notamment inférieur à 50 ppm.

Avantageusement et selon l'invention, l'excipient
5 comestible pour des rongeurs cibles nuisibles est choisi pour permettre une consommation de l'appât rodenticide par des rongeurs cibles nuisibles. Avantageusement et selon l'invention, chaque excipient comestible est non létal pour des rongeurs cibles nuisibles. L'excipient comestible n'est pas rodenticide en lui-même.

10 Avantageusement et selon l'invention, l'excipient comestible comprend au moins un aliment choisi dans le groupe formé des graines de céréale -notamment des graines de céréale décortiquées-, des moutures de graines de céréale, des farines de graines de céréale, des flocons de graines de céréale, du son de céréales et des graines non céréalières, par exemple des
15 graines de luzerne -notamment sous forme décortiquée, sous forme de mouture, sous forme de farine, sous forme de flocons ou de son-. L'excipient comestible peut comprendre tout support susceptible d'être consommé par des rongeurs cibles nuisibles.

Avantageusement, l'excipient comestible comprend au
20 moins un aliment choisi dans le groupe formé des aliments d'origine végétale et des aliments d'origine animale. Avantageusement, l'excipient comestible comprend au moins un aliment choisi pour pouvoir stimuler l'appétit des rongeurs cibles nuisibles. En particulier, cet aliment est choisi dans le groupe formé de graines d'une ou de plusieurs céréales, de graines décortiquées d'une ou
25 de plusieurs céréales, des moutures de graines d'une ou de plusieurs céréales, des flocons de graines d'une ou de plusieurs céréales, du son d'une ou de plusieurs céréales et des farines de graines d'une ou de plusieurs céréales. À titre d'exemple, on choisit les céréales dans le groupe formé de l'avoine, du blé, de l'orge, du maïs, du soja et du riz.

30 Avantageusement, l'aliment est choisi dans le groupe formé des aliments sucrés. Par exemple, il peut s'agir d'aliments comprenant au

moins un sucre choisi dans le groupe formé du saccharose, du lactose, du fructose et du glucose. Il peut s'agir d'un sirop de sucre -par exemple, d'un sirop de sucre obtenu par hydrolyse de l'amidon- ou d'un sirop de sucre obtenu par hydrolyse de saccharose (sirop de sucre inverti), ou d'un sirop de sucre de betterave, ou d'un sirop d'érable ou d'un sirop de canne à sucre, ou d'un sirop obtenu à partir d'une plante du genre *stevia*.

Avantageusement, l'aliment est choisi dans le groupe formé des flocons et de la farine de l'albumen de noix de coco (coprah). Avantageusement, l'aliment est choisi dans le groupe formé des noix, des noisettes et des amandes -râpées et/ou en poudre-.

Avantageusement, l'aliment est choisi dans le groupe formé des graisses végétales, des huiles végétales (par exemple huile de colza, graisse de soja, huile de tournesol, beurre de cacao, huile d'arachides, beurre d'arachides, huile de maïs, huile de palme), des graisses animales et des huiles animales (beurre, saindoux, huile de poisson).

Avantageusement, l'aliment est choisi dans le groupe formé des protéines d'origine végétale et des protéines d'origine animale. À titre d'exemple, on peut citer par exemple le lait en poudre -notamment le lait écrémé en poudre-, les œufs -notamment les œufs en poudre-, les hydrolysats de protéines d'origine animale et les hydrolysats de protéines d'origine végétale.

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide est choisi dans le groupe formé des appâts solides comprenant du flocoumafène et un excipient comestible solide. Avantageusement, l'appât rodenticide est un solide à l'état divisé, par exemple sous forme de boulettes ou de granulés. Avantageusement, l'appât rodenticide peut être un solide sous forme de bloc ou de pâte susceptibles d'être consommés par les rongeurs cibles nuisibles ou d'un matériau solide susceptible d'être rongé par les rongeurs cibles nuisibles. Avantageusement, l'appât rodenticide solide selon l'invention peut se présenter sous forme d'un bloc rigide, d'un bloc semi-rigide, d'une mousse, d'une poudre ou d'un gel.

Avantageusement, l'appât rodenticide se présentant sous

forme d'une poudre, sous forme d'une mousse ou sous forme d'un gel est adapté pour pouvoir souiller la fourrure du (de) rongeur(s) cible(s) nuisible(s) et pour pouvoir être ingérée par celui (ceux)-ci lors de son (leur) toilettage.

Il peut s'agir d'un appât rodenticide solide comprenant du
5 flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_1 et
dudit énantiomère E_4 . Il peut aussi s'agir d'un appât rodenticide solide
comprenant du flocoumafène et dans lequel la quantité dudit énantiomère E_1 est
supérieure à la quantité dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodenticide. Il peut
aussi s'agir d'un appât rodenticide solide comprenant du flocoumafène
10 majoritairement sous forme dudit énantiomère E_1 .

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide
est choisi dans le groupe formé des appâts liquides comprenant du flocoumafène
et un excipient comestible liquide. L'appât rodenticide est alors une boisson pour
des rongeurs cibles nuisibles.

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide
est choisi dans le groupe formé des appâts liquides comprenant du flocoumafène
et un excipient comestible liquide. L'appât rodenticide est alors une boisson pour
des rongeurs cibles nuisibles. Il peut s'agir d'une solution de flocoumafène dans
un solvant du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit
20 énantiomère E_1 et dudit énantiomère E_4 . Il peut aussi s'agir d'une solution de
flocoumafène dans un solvant du flocoumafène et dans laquelle la quantité dudit
énantiomère E_1 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_4 dans l'appât
rodenticide. Il peut aussi s'agir d'une solution de flocoumafène dans un solvant
du flocoumafène et dans laquelle le flocoumafène est majoritairement sous forme
25 dudit énantiomère E_1 .

Il peut aussi s'agir d'une suspension de flocoumafène à
l'état solide dans un milieu liquide. Il peut aussi s'agir d'une émulsion de
flocoumafène dans un milieu liquide.

L'invention concerne donc aussi un appât rodenticide
30 comprenant dudit énantiomère E_1 , à l'exclusion d'un mélange racémique dudit
énantiomère E_1 et dudit énantiomère E_4 , le flocoumafène de l'appât rodenticide

L'invention concerne aussi un procédé de lutte -notamment un procédé de lutte sélective- contre des rongeurs cibles nuisibles dans lequel on dissémine une quantité d'appât rodenticide comprenant :

5 - au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles, et ;

 - un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₁, du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₁ et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₄, du flocoumafène ;

10 ○ ledit énantiomère E₁ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t₁ ;

15 ○ ledit énantiomère E₄ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t₄ ;

t₁ et t₄ étant de valeurs telles que t₁ < t₂ < t₃ < t₄, t₂ et t₃ représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄, ladite analyse étant
20 réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

 ▪ sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 µm et présentant une taille
25 moyenne de pores de 1000 Å ;

 ▪ en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;

▪ par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 μ L de composition de flocoumafène à une concentration de 1 μ g de flocoumafène par millilitre d'acétonitrile.

L'invention concerne aussi un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles -notamment un procédé de lutte sélective contre des rongeurs cibles nuisibles femelles- dans lequel on dissémine une quantité d'appât rodenticide selon l'invention, ladite quantité d'appât étant suffisante pour être rodenticide, notamment pour des rongeurs cibles nuisibles femelles.

Dans un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, on choisit un appât rodenticide dans lequel la quantité dudit énantiomère E_1 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodenticide. Dans un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_1 .

Avantageusement et en variante selon l'invention, on choisit en combinaison :

- l'excipient comestible ;
- une quantité dudit énantiomère E_1 distincte de la quantité dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodenticide ;
- une proportion dudit énantiomère E_1 par rapport au flocoumafène ;
- une proportion massique de flocoumafène dans l'appât rodenticide, et ;
- une quantité d'appât rodenticide disséminé ;

de façon que des rongeurs cibles nuisibles femelles consomment une quantité du flocoumafène suffisante pour être létale pour lesdits rongeurs cibles nuisibles femelles consommant dudit appât rodenticide au cours d'une période unique de 24 heures consécutives.

Un appât rodenticide selon cette variante de l'invention est un appât rodenticide mortel en une seule prise ou « *one-shot* » en anglais. Avantageusement et selon cette variante de l'invention, la proportion massique du flocoumafène dans l'appât rodenticide est inférieure à 200 ppm, notamment comprise entre 2 ppm et 200 ppm, de préférence comprise entre 2 et 100 ppm,

plus préférentiellement comprise entre 2 ppm et 50 ppm, en particulier comprise entre 15 ppm et 50 ppm.

Avantageusement et dans une autre variante selon l'invention, on choisit en combinaison :

- 5 - l'excipient comestible ;
- une quantité dudit énantiomère E_1 distincte de la quantité dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodenticide ;
- une proportion dudit énantiomère E_1 par rapport au flocoumafène ;
- une proportion massique de flocoumafène dans l'appât rodenticide, et ;
- 10 - une quantité d'appât rodenticide disséminé ;

de façon que des rongeurs cibles nuisibles femelles consomment une quantité du flocoumafène ;

- o non létale pour des rongeurs cibles nuisibles femelles, c'est-à-dire généralement non létale pour les rongeurs cibles nuisibles femelles, consommant
- 15 dudit appât rodenticide pendant une période de 24 heures consécutives, et ;
- o suffisante pour être létale pour des rongeurs cibles nuisibles femelles consommant dudit appât rodenticide pendant plusieurs périodes de 24 heures.

Avantageusement et selon l'invention, lesdites périodes de 24 heures sont consécutives.

- 20 Cette autre variante de l'invention vise donc aussi un procédé de lutte sélective contre des rongeurs cibles nuisibles dans lequel on dissémine une quantité d'appât rodenticide létale pour des rongeurs cibles nuisibles femelles consommant durablement cet appât rodenticide et généralement non létale pour les rongeurs ou des animaux non cibles
- 25 consommant accidentellement cet appât rodenticide. On parle alors d'un procédé de lutte « multi-doses » ou, en anglais, « *multi-feeding* ». Dans un tel procédé selon l'invention, la consommation d'appât rodenticide par un rongeur cible nuisible femelle pendant une durée de 24 heures est insuffisante pour entraîner la mort du rongeur cible nuisible, alors qu'une consommation répétée d'appât
- 30 rodenticide pendant au moins deux jours consécutifs est suffisante pour entraîner la mort du rongeur cible nuisible femelle.

Cette autre variante de l'invention vise donc un procédé de lutte sélective contre une population de rongeurs cibles nuisibles dans lequel on met à disposition des rongeurs cibles nuisibles une quantité d'appât rodenticide susceptible d'être ingérée par les rongeurs cibles nuisibles, ladite quantité d'appât rodenticide étant suffisante pour tuer des rongeurs cibles nuisibles femelles consommant ledit appât rodenticide pendant plusieurs jours.

Avantageusement, dans cette autre variante d'un procédé selon l'invention, on adapte la quantité d'appât rodenticide disséminé, la proportion massique du flocoumafène par rapport à l'appât rodenticide et la proportion dudit énantiomère E_1 par rapport audit diastéréoisomère $D_{1,4}$ pour que la consommation de l'appât rodenticide soit létale pour des rongeurs cibles nuisibles femelles consommant quotidiennement de l'appât rodenticide pendant au moins 2 périodes de 24 heures -notamment de 3 à 7 périodes-, lesdites périodes pouvant être consécutives.

Avantageusement, dans cette autre variante d'un procédé selon l'invention, la proportion dudit énantiomère E_1 étant supérieure à 95% -notamment de l'ordre de 100%- par rapport au flocoumafène dans l'appât rodenticide, la proportion massique du flocoumafène par rapport à l'appât rodenticide est comprise entre 2 ppm et 100 ppm -notamment comprise entre 2 ppm et 50 ppm, de préférence comprise entre 2 ppm et 15 ppm, en particulier de l'ordre de 10 ppm-.

Dans un procédé selon l'invention, on met à disposition des rongeurs cibles nuisibles une quantité d'appât rodenticide suffisante pour satisfaire quotidiennement l'appétit des rongeurs cibles nuisibles femelles, ledit appât rodenticide comprenant majoritairement dudit énantiomère E_1 par rapport audit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et/ou par rapport au flocoumafène.

Dans un procédé selon l'invention, on adapte la quantité d'appât rodenticide disséminé, la proportion dudit énantiomère E_1 par rapport audit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et la proportion massique du flocoumafène par rapport à l'appât rodenticide de façon à permettre une consommation d'appât

rodenticide pendant plusieurs jours par des rongeurs cibles nuisibles femelles, tout en limitant :

- les risques d'intoxication primaire de mammifères et oiseaux non cibles susceptibles de ne consommer qu'occasionnellement et accidentellement un tel appât rodenticide ;

- les risques d'intoxication secondaire, par exemple des prédateurs des rongeurs cibles, susceptibles de consommer des rongeurs -morts ou vifs- cibles ayant ingéré une quantité dudit appât rodenticide.

L'invention concerne également un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, un procédé d'obtention de ce stéréo-isomère de configuration, une composition et un appât rodenticide comprenant ce stéréo-isomère de configuration et un procédé de lutte contre les rongeurs cibles nuisibles caractérisés en combinaison par tout ou partie des caractéristiques mentionnées ci-dessus ou ci-après.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description suivante et des exemples donnés à titre uniquement non limitatif et qui se réfèrent aux figures annexées, dans lesquelles :

- la figure 1 est un chromatogramme représentatif de la séparation des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène sur colonne chirale ;

- la figure 2 est une représentation en histogramme de la rémanence de l'énantiomère E₁ du flocoumafène selon l'invention dans le foie de rats mâles et dans le foie de rats femelles.

Extraction du flocoumafène de foies de rats gavés avec du flocoumafène

Homogénéisation de l'échantillon de foie

On pèse avec précision de l'ordre de 0,525 g ($\pm 0,025$ g) de foie de rat que l'on place dans un tube en polypropylène de 50 mL. On ajoute 10 mL d'acétone et on soumet la suspension à une homogénéisation au moyen d'un homogénéisateur/disperseur Ultra-Turrax[®] pendant une durée de l'ordre de 30 sec. On rince la tige de l'homogénéisateur/disperseur à l'eau chaude puis 2 fois avec 20 mL d'acétone dans un tube en polypropylène. On centrifuge

l'homogénéat pendant 5 min à une vitesse de centrifugation de 3000 rpm (rotation par minute). On collecte et on transvase le surnageant dans un tube à essai. On soumet l'échantillon à une évaporation sous un flux d'azote (N_2) à la température de 40°C de façon à former un extrait sec.

5 Élimination des lipides

Dans le tube contenant l'extrait sec, on ajoute 1 mL d'acétonitrile de façon à solubiliser l'extrait sec. On lave la solution d'acétonitrile 2 fois successivement avec 1 mL d'hexane. L'extrait débarrassé des lipides est séché sous un flux d'azote (N_2) à la température de 40°C, puis
10 repris avec 0,5 mL de méthanol et solubilisé par agitation sous vortex. On ajoute ensuite 0,5 mL d'eau ultra-pure (Milli-Q). L'échantillon est homogénéisé sous vortex.

Extraction du flocoumafène sur phase solide (« SPE, Solid Phase Extraction »)

15 On fait passer 1 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2), puis 1 mL de méthanol (CH_3OH), puis 1 mL d'eau ultra-pure (Milli-Q) sur une cartouche Oasis HLB 1cc (WAT094225, Waters). On dépose ensuite l'extrait de foie débarrassé des lipides (1mL CH_3OH/H_2O Milli-Q) et contenant le flocoumafène en tête de la cartouche préalablement conditionnée. L'extrait de
20 foie pénètre dans la cartouche par gravité au contact de la phase solide de la cartouche. On dépose en tête de cartouche 1 mL de solution de lavage formée de méthanol (CH_3OH) et d'eau ultra-pure (H_2O) en proportion volumique de 90/10. On sèche la cartouche par aspiration sous vide connectée en partie basse de la cartouche. On dépose ensuite en tête de cartouche 1 mL de solution d'élution
25 formée de dichlorométhane (CH_2Cl_2) et de méthanol (CH_3OH) en proportion volumique de 90/10 et on collecte en bas de cartouche un éluat comprenant le flocoumafène. On évapore le solvant de l'éluat sous un flux d'azote (N_2) à la température de 40°C. On reprend l'échantillon dans 0,5 mL d'acétonitrile ($NC-CH_3$) et on filtre la solution d'acétonitrile contenant le flocoumafène sur
30 filtre de porosité 0,2 μm .

Analyse des stéréo-isomères de configuration du
flocoumafène

On sépare les stéréo-isomères de configuration du flocoumafène par chromatographie liquide à haute pression en utilisant une
5 colonne chirale LUX[®] Cellulose-4 (00F-4490-B0, phenomenex, Le Pecq, France) à titre de phase stationnaire et un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau
comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 à titre de phase mobile avec un débit de la phase mobile liquide dans
la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min. On injecte 1 µL de l'extrait de
10 foie de rat préalablement préparé comme décrit ci-dessus. La détection est effectuée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) en mode d'ionisation
négative par électronébulisation (ESI, « *ElectroSpray Ionization* »). La température du gaz nébuliseur est de 350°C et son débit est de 8 L/min. La
pression du gaz nébuliseur est portée à 2700 hPa. En particulier, on détecte les
15 transitions MRM (« *Multiple Reaction Monitoring* » m/z 541,1 → 382,1 et m/z
541,1 → 161 correspondant aux signaux du flocoumafène.

Les valeurs des temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène sont, dans les conditions
décrites, de :

- 20
- $t_1 = 4,5$ min pour l'énantiomère E_1 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$;
 - $t_2 = 6,2$ min pour l'énantiomère E_2 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$;
 - $t_3 = 6,7$ min pour l'énantiomère E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$, et ;
 - $t_4 = 9,3$ min pour l'énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$.

Les valeurs des temps de rétention t_1 , t_2 , t_3 et t_4 sont
25 susceptibles de varier, notamment avec la température de la colonne de
chromatographie. Cependant, dans ces conditions chromatographiques, l'ordre
d'élution des énantiomères du flocoumafène reste inchangé. Á titre indicatif,
pour une variation de température de quelques degrés Celsius, la valeur du temps
de rétention (t_1) dudit énantiomère E_1 selon l'invention peut varier entre 4,4 min
30 et 4,6 min. La valeur du temps de rétention (t_2) de l'énantiomère E_2 dudit
diastéréoisomère $D_{2,3}$ du flocoumafène peut varier entre 5,9 min et 6,4 min. La

valeur du temps de rétention (t_3) de l'énantiomère E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ du flocoumafène peut varier entre 6,4 min et 6,9 min. La valeur du temps de rétention (t_4) de l'énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ du flocoumafène peut varier entre 8,9 min et 9,4 min.

5 Rémanence hépatique des stéréo-isomères de configuration
du flocoumafène chez le rat mâle et chez le rat femelle

On administre par voie orale (« *per os* ») à des rats de laboratoire (rats Sprague Dawley, Charles River, Saint germain sur l'Arbresle, France) mâles et femelles, âgés de 8 semaines et pesant entre 180 et 200 g, une
10 solution comprenant du flocoumafène dans un mélange d'huile végétale et de DMSO à 5 % de façon que la quantité de flocoumafène ingérée par chaque rat soit de l'ordre de 2,3 mg par kilogramme de rat. Les rats gavés sont traités quotidiennement par administration par voie sous cutanée d'une dose de vitamine K1 à raison de 1U par rat de façon à maintenir les rats en vie pendant la durée de
15 l'expérience.

Le rapport de la somme des quantités dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 (diastéréoisomère $D_{2,3}$) sur la quantité de flocoumafène dans la solution de gavage est de 59% et le rapport de la somme des quantités dudit énantiomère E_1 et dudit énantiomère E_4 (diastéréoisomère $D_{1,4}$) sur la
20 quantité de flocoumafène dans la solution de gavage est de 41%.

À 1 jour (J+1), 3 jours (J+3) et 7 jours (J+7) après le gavage, on euthanasie 6 rats préalablement anesthésiés à l'isoflurane, on prélève le foie des rats euthanaisés puis on extrait du foie et on dose les quantités de l'énantiomère E_1 du flocoumafène selon l'invention présentes dans le foie des
25 rats gavés. Les résultats sont donnés au tableau 1 ci-après dans lequel les valeurs de la concentration de chacun des énantiomères du flocoumafène dans le foie sont la moyenne des valeurs mesurées sur les 3 rats et exprimées en nanogramme (ng) par gramme de foie et représentés en figure 2 dans laquelle la concentration dudit énantiomère E_1 dans le foie des rats mâles est représentée par des barres
30 noires et la concentration dudit énantiomère E_1 dans le foie des rats femelles est représentée par des barres à hachures obliques.

Concentration hépatique de l'énantiomère E ₁ , ng/g		J+1	J+3	J+7
Mâles	Moyenne	196,3	47,2	0
	Écart type	15,7	26,8	0
Femelles	Moyenne	4584,5	2692,2	1196,1
	Écart type	1269,7	779,6	206,1

Tableau 1

La teneur moyenne dudit énantiomère E₁ dans le foie de rats mâles est plus faible que la teneur moyenne dudit énantiomère E₁ dans le foie de rats femelles. Un appât rodenticide et un procédé de lutte sélective contre une population de rongeurs cibles nuisibles selon l'invention permet de cibler les femelles de rongeurs cibles nuisibles, en tuant lesdites femelles de rongeurs cibles nuisibles et en limitant la reproduction des rongeurs cibles nuisibles, tout en limitant les risques d'empoisonnement d'animaux -notamment d'oiseaux-prédateurs ou charognards de rongeurs nuisibles -notamment de rongeurs cibles nuisibles affaiblis ayant consommé un tel appât rodenticide (consommation secondaire). Il n'est cependant pas exclu que certains rongeurs cibles nuisibles mâles puisse être empoisonnés dans le cas d'une consommation élevée et réitérée d'appât rodenticide selon l'invention.

Il va de soi que l'invention peut faire l'objet de nombreuses variantes de réalisation et applications. En particulier, une composition, un appât rodenticide et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles sont sujets à des infinités de variantes tant dans la formulation de l'appât rodenticide que dans les modes de mise en œuvre du procédé.

REVENDICATIONS

1/- Stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₁, du flocoumafène, ledit énantiomère E₁ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions 5 décrites ci-après, un temps de rétention t₁ de valeur telle que t₁ < t₂ < t₃ < t₄; t₂, t₃ et t₄ représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E₁, ladite analyse étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

10 - sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 µm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;

15 - en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;

20 - par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 µL de composition de flocoumafène à une concentration de 1 µg de flocoumafène par millilitre d'acétonitrile.

2/- Composition comprenant un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₁, du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₁ et d'un stéréo-isomère de configuration, dit 25 énantiomère E₄, du flocoumafène ;

- ledit énantiomère E₁ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t₁ ;

- ledit énantiomère E₄ présentant, par analyse d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t₄ ; t₁ et t₄ étant de valeurs telles que t₁ < t₂ < t₃ < t₄ ;

5 t₂ et t₃ et t₄ représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄, ladite analyse étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

10 ▪ sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 µm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;

15 ▪ en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;

20 ▪ par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 µL de composition de flocoumafène à une concentration de 1 µg de flocoumafène par millilitre d'acétonitrile.

3/- Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que la quantité dudit énantiomère E₁ est supérieure à la quantité dudit énantiomère E₄ dans la composition.

25 4/- Composition selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E₁ dans la composition.

30 5/- Composition selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité dudit énantiomère E₁ telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur à 25%.

6/ - Composition selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité dudit énantiomère E_1 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur à 95%.

5 7/ - Appât rodenticide comprenant une composition selon l'une des revendications 2 à 6, et au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles.

8/ - Appât selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'excipient comestible comprend au moins un aliment choisi dans le groupe
10 formé des graines de céréale, des moutures de graines de céréale, des farines de graines de céréale, des flocons de graines de céréale, du son de céréales et des graines non céréalières.

9/ - Appât selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité massique de flocoumafène telle
15 que le rapport de cette quantité massique de flocoumafène sur la quantité d'appât rodenticide est inférieur à 200 ppm.

10/ - Procédé de lutte sélective contre des rongeurs cibles nuisibles, dans lequel on dissémine une quantité d'appât rodenticide comprenant :

20 - au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles, et ;

- un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_1 , du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_1 et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_4 , du flocoumafène ;

25 ○ ledit énantiomère E_1 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t_1 ;

30 ○ ledit énantiomère E_4 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de

configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t_4 ;

t_1 et t_4 étant de valeurs telles que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$, t_2 et t_3 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_1 et dudit énantiomère E_4 , ladite analyse étant

5 réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

- sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate),

10 lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;

- en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile

15 liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;

- par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 μL de composition de flocoumafène à une concentration de 1 μg de flocoumafène par millilitre d'acétonitrile.

11/ - Procédé chromatographique d'obtention dudit

20 énantiomère E_1 selon la revendication 1, dans lequel :

- on choisit une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille

25 moyenne de pores de 1000 Å ;

- on choisit, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;

- on réalise une séparation des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène à température ambiante lors de laquelle ;

30

- on introduit en tête de la colonne pour chromatographie une composition liquide comprenant dudit énantiomère E_1 , puis ;

5 - on entraîne la composition liquide avec la phase mobile dans la colonne pour chromatographie dans des conditions propres à séparer les stéréo-isomères de configuration du flocoumafène, et on collecte une fraction de la phase mobile comprenant ledit énantiomère E_1 avec un temps de rétention t_1 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_2 , t_3 et t_4 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_1 , séparément dudit énantiomère E_4 de temps de rétention t_4 , et ;

10 - on élimine la phase mobile liquide de ladite fraction de façon à obtenir ledit énantiomère E_1 .

1 / 1

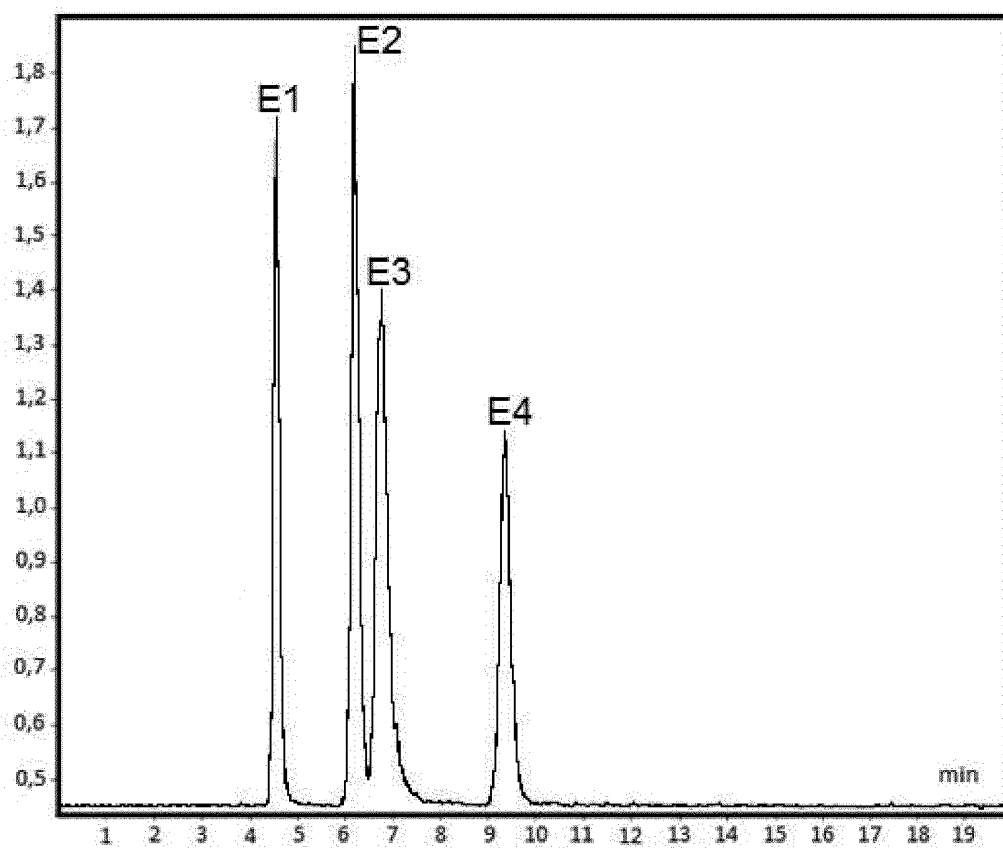


Fig 1

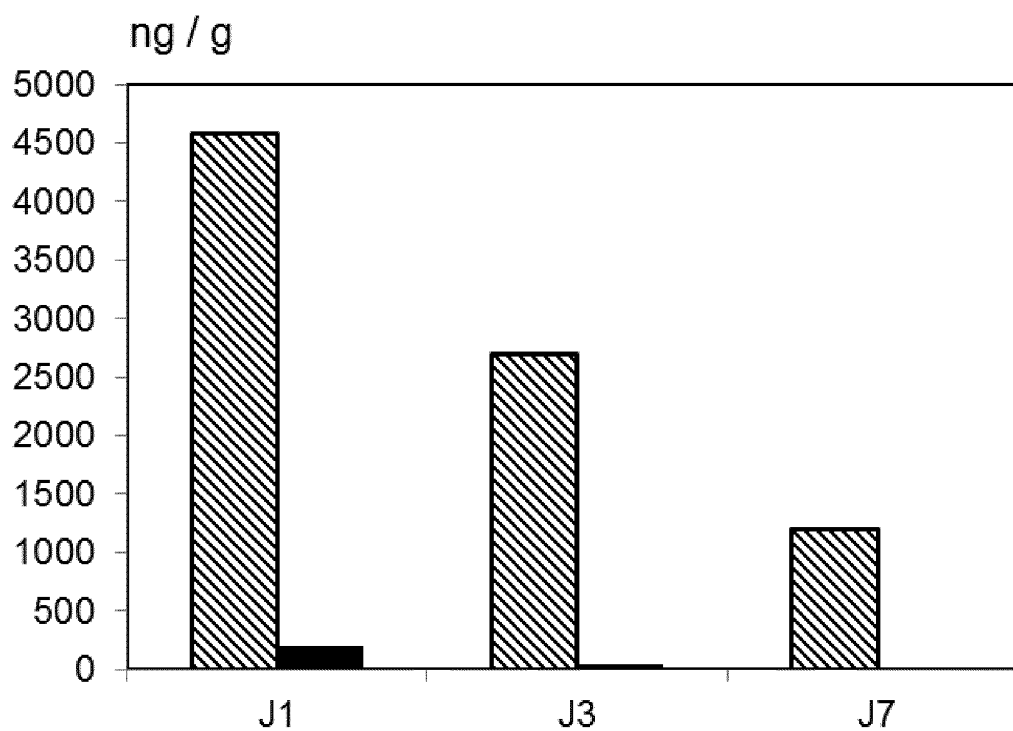


Fig 2

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 818065
FR 1562164

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EP 0 147 052 A2 (ICI PLC [GB]) 3 juillet 1985 (1985-07-03)	1	C07D311/56 A01N43/16 A01P11/00 C07D311/56 A01N43/16
Y	* page 7, lines 20-24 * -----	2-11	
Y	EP 0 098 629 A1 (SHELL INT RESEARCH [NL]) 18 janvier 1984 (1984-01-18) * page 14 - page 15 *	1-11	
Y	EP 0 175 466 A2 (ICI PLC [GB]) 26 mars 1986 (1986-03-26) * exemple 1 *	1-11	
A	JUNG, JAE-CHUL ET AL: "Total synthesis of flocoumafen via Knoevenagel condensation and intramolecular ring cyclization: general access to natural products", MOLECULES, vol. 17, 2012, pages 2091-2102, XP002755590, DOI: 10.3390/MOLECULES17022091 * le document en entier *	1-11	
A	-& JUNG, JAE-CHUL ET AL: "Electronic Supplementary Information for Total synthesis of flocoumafen via Knoevenagel condensation and intramolecular ring cyclization: general access to natural products", MOLECULES, 2012, page 26PP, XP002755781, DOI: 10.3390/MOLECULES17022091 * le document en entier *	1-11	
E	WO 2015/189320 A1 (LIPHATECH [FR]) 17 décembre 2015 (2015-12-17) * pages 7,12,37 *	1-11	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		17 mars 2016	Frelon, Didier
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1562164 FA 818065**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 17-03-2016

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication			
EP 0147052	A2	03-07-1985	AU 578051 B2	13-10-1988			
			AU 3605584 A	20-06-1985			
			BE 901269 A1	13-06-1985			
			BR 8406355 A	08-10-1985			
			CA 1253797 A	09-05-1989			
			CS 249532 B2	12-03-1987			
			DE 3485917 D1	15-10-1992			
			DE 3485917 T2	14-01-1993			
			DK 601384 A	15-06-1985			
			EP 0147052 A2	03-07-1985			
			ES 8507319 A1	16-12-1985			
			GB 2152375 A	07-08-1985			
			GR 81141 B	18-12-1984			
			HK 98390 A	30-11-1990			
			HU 196108 B	28-10-1988			
			IE 58628 B1	20-10-1993			
			IL 73781 A	31-10-1989			
			JP H0542402 B2	28-06-1993			
			JP S60197604 A	07-10-1985			
			LT 869 A	27-03-1995			
			NZ 210336 A	29-05-1987			
			OA 7893 A	20-11-1986			
			PH 21381 A	15-10-1987			
			PT 79665 A	01-01-1985			
			SU 1748627 A3	15-07-1992			
			US 4783481 A	08-11-1988			
			ZA 8409291 A	31-07-1985			
			ZW 18984 A1	09-07-1986			

			EP 0098629	A1	18-01-1984	AR 240672 A1	31-08-1990
						AU 557538 B2	24-12-1986
						BR 8303087 A	31-01-1984
						CS 8304200 A2	13-06-1985
DD 210420 A5	13-06-1984						
DE 3373184 D1	01-10-1987						
DK 268083 A	15-12-1983						
DZ 544 A1	13-09-2004						
EG 16959 A	30-03-1991						
EP 0098629 A1	18-01-1984						
ES 8500258 A1	01-01-1985						
FI 832093 A	15-12-1983						
GB 2126578 A	28-03-1984						
GR 79294 B	22-10-1984						
HK 60089 A	04-08-1989						
HU 194021 B	28-01-1988						
IE 55794 B1	16-01-1991						

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1562164 FA 818065**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 17-03-2016

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		IL 68946 A	30-06-1988
		IN 161543 B	19-12-1987
		KE 3885 A	11-08-1989
		MA 19813 A1	31-12-1983
		NO 832124 A	15-12-1983
		OA 7463 A	31-12-1984
		PH 21209 A	19-08-1987
		PL 242468 A1	28-01-1986
		TR 22258 A	25-11-1986
		US 4520007 A	28-05-1985
		ZW 13383 A1	31-08-1983

EP 0175466	A2	26-03-1986	DE 3573118 D1
			EP 0175466 A2
			US 4788297 A

WO 2015189320	A1	17-12-2015	FR 3022110 A1
			WO 2015189320 A1
