(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 044 875***

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **15 62192**

(51) Int Cl[8] : ***A 01 N 43/16*** *(2017.01)*

(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) APPAT RODONTICIDE COMPRENANT DU BRODIFACOUM ET PROCEDE DE LUTTE CONTRE DES RONGEURS CIBLES NUISIBLES.

(57) L'invention concerne appât rodonticide comprenant du brodifacoum et au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles, caractérisé en ce que l'appât rodonticide comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_3, du brodifacoum telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%, ledit énantiomère E_3 présentant, par analyse chromatographique, un temps de rétention t_3 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_1, t_2 et t_4 représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit énantiomère E_3, l'analyse chromatographique étant réalisée à la température de 23,5°C.

FR 3 044 875 - A1

APPÂT RODONTICIDE COMPRENANT DU BRODIFACOUM ET PROCÉDÉ DE LUTTE CONTRE DES RONGEURS CIBLES NUISIBLES

L'invention concerne un appât rodonticide comprenant du brodifacoum et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles. L'invention concerne également un procédé de séparation des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum. L'invention concerne donc le domaine technique de la lutte contre le développement de populations de rongeurs cibles nuisibles.

On sait de EP 0 147 052 que le stéréo-isomère « trans » du brodifacoum est métabolisé plus rapidement que le stéréo-isomère « cis » dans les tissus d'espèces non-cible et non-rongeurs et que l'utilisation de ce stéréo-isomère « trans » du brodifacoum permet de diminuer les risques d'empoisonnement de ces espèces non-cible. En particulier EP 0 147 052 décrit un appât rodonticide comprenant du brodifacoum sous forme de stéréo-isomère « trans » dans une proportion de 50 ppm.

Un tel appât est susceptible d'être consommé par des 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 induire chez ces animaux domestiques, chez ces animaux de compagnie ou chez ces humains un empoisonnement qui peut être létal.

En outre, une fraction du brodifacoum de ces appâts rodonticides peut être ingérée (consommation secondaire) par des animaux -notamment par des oiseaux, en particulier des rapaces- prédateurs ou charognards de rongeurs nuisibles et notamment de rongeurs cibles nuisibles affaiblis ayant consommé un tel appât rodonticide. Cette consommation secondaire est susceptible d'entrainer à terme la mort 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 proposant un appât rodonticide comprenant du brodifacoum 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 cependant de limiter les risques d'empoisonnement d'espèces non cibles, par exemple des animaux domestiques ou des animaux de compagnie, ou encore des humains, susceptibles de consommer accidentellement de tels appâts rodonticides.

L'invention vise donc à pallier ces inconvénients en proposant un appât rodonticide comprenant du brodifacoum 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 cependant de limiter les risques d'empoisonnement par consommation secondaire d'animaux domestiques (animaux de compagnie ou d'élevage) ou sauvages -par exemple des renards ou des oiseaux- prédateurs de rongeurs cibles nuisibles ayant consommé de l'appât rodonticide ou charognards de cadavres de rongeurs cibles nuisibles empoisonnés.

L'invention vise aussi à proposer un appât rodonticide comprenant du brodifacoum et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles dont la mise en œuvre est en accord avec les règles de bon usage -notamment vis à vis de la protection des oiseaux, et en particulier des rapaces-.

L'invention vise aussi à proposer un appât rodonticide comprenant du brodifacoum et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui sont respectueux de l'environnement, de la santé humaine et des animaux non cible.

L'invention vise aussi à proposer à proposer un appât rodonticide comprenant du brodifacoum et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui sont susceptibles d'être utilisés pour lutter contre des rongeurs cibles nuisibles devenus résistants à des appâts connus de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles.

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

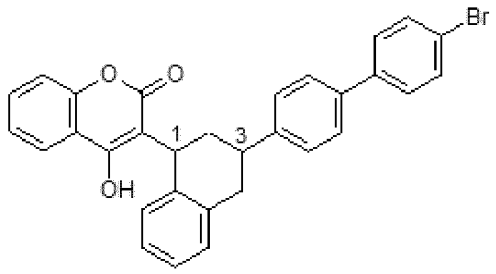
Pour ce faire, l'invention concerne un appât rodonticide comprenant du brodifacoum et au moins un excipient comestible pour des

rongeurs cibles nuisibles, caractérisé en ce que l'appât rodonticide comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_3, du brodifacoum telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%, ledit énantiomère E_3 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum, un temps de rétention t_3 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_1, t_2 et t_4 représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit énantiomère E_3, l'analyse chromatographique étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions ci-après :

- 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-méthylbenzoate), 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 de méthanol (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 95/5 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 la composition de brodifacoum à une concentration de 1 µg de brodifacoum par millilitre d'acétonitrile.

Dans tout le texte :

- le terme « brodifacoum » désigne le composé de formule 3-(4'-bromobiphényl-4-yl)-1-(4-hydroxycoumarin-3-yl)-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène ou 4-hydroxy-3-(3-(4'-bromo-4-biphénylyl)-1,2,3,4-tétrahydro-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 « diastéréoisomères » désigne des stéréo-isomères de configuration qui ne sont pas des énantiomères, c'est-à-dire des stéréo-isomères de configuration qui présentent le même enchaînement d'atomes, mais dont les structures ne sont ni superposables, ni image l'une de l'autre dans un miroir ;

- 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 structurelle 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 une colonne de chromatographie.

L'invention concerne donc un appât rodonticide comprenant du brodifacoum, ledit appât rodonticide comprenant un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles et une quantité dudit énantiomère E_3 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%.

Les inventeurs sont parvenus à séparer ledit énantiomère E_3 des autres stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit énantiomère E_3, et à préparer un appât rodonticide selon l'invention dans lequel la quantité dudit énantiomère E_3 est telle que son rapport sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%.

Ils ont réalisé une telle séparation par chromatographie liquide à haute pression sur colonne chirale LUX® Cellulose-3 (00F-4492-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 recherchée de chaque stéréo-isomère de configuration du brodifacoum à la pureté souhaitée. Les inventeurs ont réussi à obtenir chaque stéréo-isomère de configuration du brodifacoum par séparation chromatographique, en collectant successivement et séparément chaque stéréo-isomère de configuration du brodifacoum en sortie de colonne, puis en éliminant la phase mobile de chaque fraction collectée. Ils ont aussi découvert qu'il est possible d'obtenir ces stéréo-isomères de configuration du brodifacoum par chromatographie liquide à haute pression sur colonne chirale

préparative dans laquelle la phase stationnaire présente une granulométrie supérieure à 3 µm.

Les inventeurs ont observé que l'analyse du brodifacoum par chromatographie liquide à haute pression dans les conditions décrites ci-dessus fait apparaitre quatre signaux ou pics correspondant à quatre composés de même formule chimique développée et correspondant à la formule (I) du brodifacoum. Ils ont déterminé, par l'analyse de préparations de brodifacoum comprenant des proportions variables de diastéréoisomères du brodifacoum, que les deux composés correspondants au signal présentant un temps de rétention t_1 d'une valeur de l'ordre de 15,4 min et au signal présentant un temps de rétention t_4 d'une valeur de l'ordre de 26,3 min sont les énantiomères, dits énantiomère E_1 et énantiomère E_4, de l'un des deux diastéréoisomères, dit diastéréoisomère $D_{1,4}$, du brodifacoum et que les deux composés correspondants au signal présentant un temps de rétention t_2 d'une valeur de l'ordre de 17,2 min et au signal présentant un temps de rétention t_3 d'une valeur de l'ordre de 19,9 min sont les énantiomères, dits énantiomère E_2 et énantiomère E_3 d'un autre diastéréoisomère, dit diastéréoisomère $D_{2,3}$, du brodifacoum distinct dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$. L'un des deux diastéréoisomères du brodifacoum est un stéréo-isomère de configuration du brodifacoum dans lequel les carbones 1 et 3 du groupement 1,2,3,4-tétrahydronaphtalène du brodifacoum sont de même configuration absolue et l'autre des deux diastéréoisomères du brodifacoum est un stéréo-isomère de configuration du brodifacoum dans lequel les carbones 1 et 3 du groupement 1,2,3,4-tétrahydronaphtalène du brodifacoum sont de configurations absolues distinctes, les configurations absolues étant déterminées selon les règles séquentielles de priorité et la nomenclature de Cahn, Ingold et Prelog (CIP).

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'élution des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum reste inchangé.

Il est possible de doser les énantiomères (E_2 et E_3) dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ et les énantiomères (E_1 et E_4) dudit diastéréoisomère $D_{1,3}$

d'une composition comprenant du brodifacoum par analyse et séparation des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum par chromatographie liquide à haute pression 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 brodifacoum, en réalisant une détection quantitative des énantiomères en sortie de colonne séparative, par exemple par photométrie d'absorption, en ajustant la concentration en brodifacoum 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, E_2, E_3 et E_4. Il est aussi possible de doser chaque énantiomère E_1, E_2, E_3 et E_4 de toute composition comprenant du brodifacoum en réalisant une détection par spectrométrie de masse en sortie de colonne séparative.

Il n'était pas connu antérieurement de pouvoir séparer ledit énantiomère E_3 dudit énantiomère E_2 et les énantiomères (E_1 et E_4) dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ du brodifacoum.

Les inventeurs qui sont donc parvenus à séparer ces quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum ont observé de façon totalement surprenante que les énantiomères (E_1 et E_4) dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et les énantiomères (E_2 et E_3) dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ ne présentent pas la même rémanence dans le foie de rongeurs cibles nuisibles et que ledit énantiomère E_3 est plus rémanent dans le foie de rongeurs cibles nuisibles que ne le sont l'énantiomère E_2 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ et que ne le sont les énantiomères E_1 et E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$.

Ils ont déterminé que ledit énantiomère E_3 est en fait le stéréo-isomère de configuration du brodifacoum qui s'accumule le plus dans le foie de rongeurs cibles nuisibles ayant ingéré du brodifacoum. De tels rongeurs cibles nuisibles ayant accumulé dudit énantiomère E_3 constituent des proies empoisonnées et toxiques pour des mammifères non-rongeurs et d'oiseaux consommant au moins un tel rongeur cible nuisible -mort ou vif- et en particulier pour des prédateurs ou des charognards (notamment des mammifères non-rongeurs et des oiseaux) qui consomment préférentiellement les viscères de leurs

proies et en particulier le foie de leurs proies. Les inventeurs ont découvert que ledit énantiomère E_3 est le stéréo-isomère de configuration du brodifacoum qui est le plus toxique vis-à-vis d'animaux non cibles et vis-à-vis de l'environnement.

L'invention concerne donc un appât rodonticide comprenant du brodifacoum dans lequel le rapport de la quantité dudit énantiomère E_3 sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%. L'invention concerne donc un appât rodonticide comprenant du brodifacoum dans lequel la quantité du stéréo-isomère de configuration du brodifacoum le plus rémanent dans le foie de rongeurs cible nuisibles et le plus écotoxique est telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%.

Un appât rodonticide selon l'invention à faible teneur en énantiomère E_3 permet de limiter la quantité de brodifacoum résiduelle dans le foie des rongeurs cibles nuisibles mais est cependant rodonticide. Un tel appât rodonticide 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 affaiblis ayant consommé un tel appât rodonticide. Un appât rodonticide selon l'invention comprenant une quantité dudit énantiomère E_3 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10% permet en fait, et ce de façon totalement surprenante, de lutter efficacement contre des rongeurs cibles nuisibles.

Avantageusement et dans un mode de réalisation selon l'invention, la quantité dudit énantiomère E_3 dans l'appât rodonticide est telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 8%, notamment inférieur à 5%, de préférence inférieur à 3%, plus préférentiellement inférieur à 2%, encore plus préférentiellement inférieur à 1%.

Avantageusement et dans un autre mode de réalisation selon l'invention, l'appât rodonticide peut être sensiblement exempt dudit

énantiomère E_3, c'est à dire que ledit énantiomère E_3 peut être présent dans l'appât rodonticide mais seulement à l'état de trace. Avantageusement, l'appât rodonticide est sensiblement exempt dudit énantiomère E_3. Un aspect particulier de l'invention concerne donc un appât rodonticide comprenant du brodifacoum et qui est sensiblement -notamment totalement- exempte dudit énantiomère E_3.

Avantageusement et dans un mode particulier de réalisation selon l'invention, la quantité dudit énantiomère E_3 dans l'appât rodonticide peut être différente de la quantité dudit énantiomère E_2 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$, ledit énantiomère E_2 présentant, par analyse chromatographique de brodifacoum dans les conditions précitées, un temps de rétention t_2 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$. Dans un appât rodonticide selon l'invention, ledit énantiomère E_3 et ledit énantiomères E_2 ne sont pas en mélange équimoléculaire et ne forment pas un mélange racémique.

Avantageusement et dans un autre mode particulier de réalisation, ledit énantiomère E_2 et ledit énantiomère E_3 peuvent être en quantité équimoléculaire dans l'appât rodonticide. Dans cet autre mode de réalisation, l'appât rodonticide peut comprendre un mélange racémique dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3.

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodonticide comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_2, du brodifacoum, ledit énantiomère E_2 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans les conditions précitées, un temps de rétention t_2 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$, la quantité dudit énantiomère E_2 étant telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%.

Avantageusement et dans un mode de réalisation particulier selon l'invention, la quantité dudit énantiomère E_2 dans l'appât rodonticide est telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 8%, notamment inférieur à 5%, de préférence inférieur à 3%, plus préférentiellement inférieur à 2%, encore plus préférentiellement

inférieur à 1%.

Avantageusement et dans ce mode de réalisation particulier selon l'invention, l'appât rodonticide peut être sensiblement exempt dudit énantiomère E_2, c'est à dire que ledit énantiomère E_2 peut être présent dans l'appât rodonticide mais seulement à l'état de trace. Avantageusement, l'appât rodonticide peut aussi être exempt dudit énantiomère E_2.

Ce mode de réalisation particulier selon l'invention concerne donc un appât rodonticide comprenant du brodifacoum, qui est sensiblement -notamment totalement- exempt dudit énantiomère E_3 et qui est aussi sensiblement -notamment totalement- exempt dudit énantiomère E_2. Selon cet aspect de l'invention, l'appât rodonticide est aussi sensiblement -notamment totalement- exempt dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$.

Avantageusement et dans un autre mode de réalisation particulier selon l'invention, l'appât rodonticide peut comprendre une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de la quantité dudit énantiomère E_2 dans l'appât rodonticide sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est compris entre 30% et 100% (borne incluse), notamment compris entre 90% (borne incluse) et 100% (borne incluse).

Avantageusement et dans un autre mode de réalisation particulier selon l'invention, l'appât rodonticide comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_1, du brodifacoum, ledit énantiomère E_1 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans les conditions précitées, un temps de rétention t_1 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$, la quantité dudit énantiomère E_1 étant telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%.

Avantageusement et dans cet autre mode de réalisation particulier selon l'invention, la quantité dudit énantiomère E_1 dans l'appât rodonticide est telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 8%, notamment inférieur à

5%, de préférence inférieur à 3%, plus préférentiellement inférieur à 2%, encore plus préférentiellement inférieur à 1%.

Avantageusement et dans cet autre mode de réalisation selon l'invention, l'appât rodonticide peut être sensiblement exempt dudit énantiomère E_1, c'est à dire que ledit énantiomère E_1 peut être présent dans l'appât rodonticide mais seulement à l'état de trace. Avantageusement, l'appât rodonticide peut être exempt dudit énantiomère E_1.

Un autre aspect particulier de l'invention concerne donc un appât rodonticide comprenant du brodifacoum, qui est sensiblement -notamment totalement- exempt dudit énantiomère E_3 du brodifacoum, qui est aussi sensiblement -notamment totalement- exempt dudit énantiomère E_2 du brodifacoum, et qui est aussi sensiblement -notamment totalement- exempt dudit énantiomère E_1 du brodifacoum.

Avantageusement et dans un autre mode de réalisation particulier selon l'invention, l'appât rodonticide peut comprendre une quantité dudit énantiomère E_1 telle que le rapport de la quantité dudit énantiomère E_1 dans l'appât rodonticide sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est compris entre 30% et 100% (borne incluse), notamment compris entre 90% (borne incluse) et 100% (borne incluse).

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodonticide comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_4, du brodifacoum, ledit énantiomère E_4 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans les conditions précitées, un temps de rétention t_4 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$, le rapport de la quantité dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodonticide sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide étant compris entre 30% et 100% (borne incluse), notamment compris entre 90% (borne incluse) et 100% (borne incluse).

Les inventeurs qui sont parvenus à séparer ledit énantiomère E_1 et ledit énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et ledit énantiomère E_2 et ledit énantiomère E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ et à isoler

ledit énantiomère E_4, ont aussi découvert, de façon totalement surprenante et imprévisible, que :

- la rémanence dudit énantiomère E_4 dans le foie de rongeurs cibles nuisibles femelles ayant consommé un tel appât rodonticide selon l'invention est supérieure à la rémanence dudit énantiomère E_4 dans le foie de rongeurs cibles nuisibles mâles ayant consommé un tel appât rodonticide, et que ;
- la rémanence dudit énantiomère E_4 dans le foie de rongeurs cibles nuisibles femelles est suffisante pour être rodonticide au moins pour les rongeurs cibles nuisibles femelles.

Ils ont découvert qu'il est de cette façon 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.

Un appât rodonticide selon l'invention comprenant du brodifacoum majoritairement sous forme dudit énantiomère E_4 présente une efficacité rodonticide élevée vis-à-vis de rongeurs cibles nuisibles femelles et permet de limiter le nombre de portées de rongeurs cibles nuisibles, tout en limitant la quantité résiduelle de brodifacoum dans le foie des rongeurs cibles nuisibles mâles.

Un tel appât rodonticide permet de limiter la quantité de brodifacoum résiduelle dans le foie des rats mâles tout en maintenant dans le foie des rats femelles une quantité de brodifacoum qui est rodonticide pour lesdites femelles de rongeurs cibles nuisibles. Un tel appât rodonticide selon l'invention est donc encore moins toxique pour l'environnement que ne l'est le brodifacoum, 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 affaiblis ayant consommé un tel appât rodonticide, mais conserve une activité anticoagulante suffisante, en particulier sur les femelles de rongeurs cibles nuisibles, pour que l'appât soit rodonticide.

Les inventeurs ont aussi observé qu'un appât selon l'invention est susceptible de pouvoir être utilisé pour lutter contre des

populations de rongeurs cibles nuisibles résistants à des traitements rodonticides connus.

Avantageusement, un appât rodonticide selon l'invention comprend une quantité massique de brodifacoum telle que le rapport de cette quantité massique de brodifacoum sur la quantité massique d'appât rodonticide est inférieur à 200 ppm -c'est-à-dire inférieur à 200 mg de brodifacoum par kilogramme d'appât rodonticide-. Avantageusement, il comprend une quantité massique de brodifacoum telle que le rapport de cette quantité massique de brodifacoum sur la quantité massique d'appât est compris entre 1 ppm et 200 ppm. Avantageusement, un appât rodonticide selon l'invention comprend une quantité massique de brodifacoum telle que le rapport de cette quantité massique de brodifacoum sur la quantité massique d'appât est compris entre 1 ppm et 100 ppm (1 mg à 100 mg de brodifacoum par kilogramme d'appât rodonticide), notamment compris entre 1 ppm et 50 ppm (1 mg à 50 mg de brodifacoum par kilogramme d'appât rodonticide), de préférence compris entre 1 ppm et 25 ppm (1 mg à 25 mg de brodifacoum par kilogramme d'appât rodonticide).

Avantageusement et selon l'invention, l'excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles est choisi pour permettre une consommation de l'appât rodonticide 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 rodonticide en lui-même.

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 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 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 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.

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 rodonticide est choisi dans le groupe formé des appâts solides comprenant du brodifacoum et un excipient comestible à l'état solide. Avantageusement, l'appât rodonticide est un solide à l'état divisé, par exemple sous forme de boulettes ou de granulés. Avantageusement, l'appât rodonticide 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 rodonticide 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 rodonticide peut se présenter sous forme d'une poudre, sous forme d'une mousse ou sous forme d'un gel. En particulier, un tel appât rodonticide 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.

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodonticide est choisi dans le groupe formé des appâts liquides comprenant du brodifacoum et un excipient comestible liquide. L'appât rodonticide est alors une boisson pour des rongeurs cibles nuisibles. Il peut aussi s'agir d'une suspension de brodifacoum à l'état solide dans un milieu liquide. Il peut aussi s'agir d'une émulsion de brodifacoum dans un milieu liquide.

Avantageusement, l'appât rodonticide comprend au moins un colorant. Un tel colorant permet en particulier de donner audit appât rodonticide une couleur aisément détectable et identifiable par une personne manipulant l'appât rodonticide.

Avantageusement, l'appât rodonticide comprend au moins un conservateur apte à assurer sa conservation lors de son stockage. Avantageusement, l'appât rodonticide comprend au moins un composé amérisant de type benzoate de dénatonium, aussi connu sous le nom de « Bitrex® » destiné

à réduire les risques de consommation accidentelle par des organismes non cibles.

Avantageusement, dans une variante particulière, l'appât rodonticide selon l'invention comprend exclusivement du brodifacoum à titre de substance rodonticide. En particulier, l'appât rodonticide selon l'invention est exempt de toute autre substance anticoagulante à usage rodonticide distincte du brodifacoum. Cependant, dans cette variante selon l'invention, l'appât rodonticide peut comprendre toute substance anti-nuisible autre qu'un rodonticide, telle qu'une substance insecticide et/ou acaricide.

Avantageusement, dans une autre variante particulière, l'appât rodonticide selon l'invention comprend du brodifacoum et au moins une autre substance distincte du brodifacoum à titre de substance rodonticide. Cette autre substance rodonticide distincte du brodifacoum peut être une autre substance anticoagulante -notamment du type anti-vitamine K ou non- ou toute autre substance rodonticide non anticoagulante.

L'invention concerne aussi un procédé chromatographique de séparation des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum. L'invention concerne donc un tel procédé chromatographique de séparation de stéréo-isomères de configuration du brodifacoum, 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-méthylbenzoate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 µm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;
- on choisit, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé de méthanol (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 95/5 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 brodifacoum à température ambiante, lors de laquelle ;

- on introduit en tête de la colonne pour chromatographie une composition liquide comprenant des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum, puis ;

- on entraine la composition liquide avec la phase mobile dans la colonne pour chromatographie dans des conditions propres à entrainer ladite séparation des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum et on collecte une pluralité de fractions de la phase mobile, chaque fraction comprenant l'un des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum séparément des autres stéréo-isomères de configuration du brodifacoum, et ;

- on élimine la phase mobile liquide de chaque fraction de façon à obtenir chaque stéréo-isomère de configuration du brodifacoum.

L'invention concerne aussi un stéréo-isomère de configuration du brodifacoum obtenu par un procédé selon l'invention.

L'invention concerne aussi un procédé de lutte -notamment de lutte sélective- contre des rongeurs cibles nuisibles dans lequel on dissémine une quantité d'appât rodonticide selon l'invention.

L'invention concerne aussi un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles dans lequel on dissémine une quantité d'appât rodonticide comprenant du brodifacoum et au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles, caractérisé en ce que l'appât rodonticide comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_3, du brodifacoum telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%, ledit énantiomère E_3 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum, un temps de rétention t_3 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_1, t_2 et t_4 représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit énantiomère E_3, l'analyse chromatographique étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions ci-après :

- 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-méthylbenzoate), 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 de méthanol (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 95/5 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 brodifacoum à une concentration de 1 µg de brodifacoum par millilitre d'acétonitrile.

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

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

- l'excipient comestible ;
- la quantité dudit énantiomère E_3 ;
- une proportion massique de brodifacoum dans l'appât rodonticide ;
- une quantité d'appât rodonticide disséminé ;

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

Un appât rodonticide selon cette variante de l'invention est un appât rodonticide létal en une seule prise ou « *one-shot* » en anglais. Avantageusement et selon cette variante de l'invention, la proportion massique du brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieure à 200 ppm, notamment comprise entre 2 ppm et 200 ppm, de préférence comprise entre 2 ppm et 100 ppm, plus préférentiellement comprise entre 2 ppm et 50 ppm, encore plus préférentiellement comprise entre 5 ppm et 25 ppm. Avantageusement, la

proportion massique du brodifacoum dans l'appât rodonticide peut être comprise entre 10 ppm et 15 ppm.

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

- l'excipient comestible ;
- la quantité dudit énantiomère E_3 ;
- une proportion massique de brodifacoum dans l'appât rodonticide ;
- une quantité d'appât rodonticide disséminé ;

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

o non létale pour des rongeurs cibles nuisibles, c'est-à-dire généralement non létale pour les rongeurs cibles nuisibles, consommant dudit appât rodonticide pendant une période unique de 24 heures consécutives, et ;

o suffisante pour être létale pour des rongeurs cibles nuisibles consommant dudit appât rodonticide pendant plusieurs périodes de 24 heures, lesdites périodes étant consécutives.

Cette autre variante de l'invention vise donc aussi un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles dans lequel on dissémine une quantité d'appât rodonticide létale pour des rongeurs cibles nuisibles consommant durablement cet appât rodonticide et non létale pour des rongeurs ou des animaux non cibles consommant accidentellement cet appât rodonticide. 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 rodonticide par un rongeur cible nuisible pendant une durée de 24 heures est insuffisante pour entrainer la mort dudit rongeur, alors qu'une consommation répétée d'appât rodonticide pendant au moins deux jours consécutifs permet d'entrainer la mort du rongeur cible nuisible.

Avantageusement et dans cette autre variante selon l'invention la proportion massique de brodifacoum peut être comprise entre 2 ppm et 100 ppm -notamment comprise entre 2 ppm et 50 ppm en particulier comprise entre 2 ppm et 15 ppm- par rapport à l'appât rodonticide.

Cette autre variante de l'invention vise donc un procédé de lutte contre une population de rongeurs cibles nuisibles dans lequel on met à disposition des rongeurs cibles nuisibles une quantité d'appât rodonticide susceptible d'être ingérée par les rongeurs cibles nuisibles, ladite quantité d'appât rodonticide étant suffisante pour tuer des rongeurs cibles nuisibles consommant quotidiennement ledit appât rodonticide pendant plusieurs jours, notamment pendant au moins 2 périodes de 24 heures -notamment de 3 à 7 périodes-, lesdites périodes étant consécutives.

Dans un procédé selon l'invention, on choisit un appât rodonticide selon l'invention et la quantité d'appât rodonticide disséminé de façon à permettre une consommation d'appât rodonticide pendant plusieurs jours par des rongeurs cibles nuisibles, 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 rodonticide ;
- 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 rodonticide.

L'invention concerne également un appât rodonticide, un procédé de lutte contre les rongeurs cibles nuisibles et un procédé d'obtention d'un stéréo-isomère de configuration du brodifacoum 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 brodifacoum sur colonne chirale ;

– la figure 2 est une représentation graphique en histogramme de la rémanence des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum dans le foie de rats ;

– la figure 3 est une représentation graphique représentative de la rémanence hépatique de l'énantiomère E_4 du brodifacoum chez des rats males et chez des rats femelles.

Analyse des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum

On sépare les stéréo-isomères de configuration du brodifacoum dans les extraits de foie. On réalise une telle séparation des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum par chromatographie liquide à haute pression en utilisant une colonne chirale LUX® Cellulose-3 (00F-4492-B0, phenomenex, Le Pecq, France) à titre de phase stationnaire et un mélange formé de méthanol (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 95/5 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 sur la colonne 1 µL de l'extrait hépatique de foie préparé comme préalablement décrit. 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 transitions MRM (« *Multiple Reaction Monitoring* » m/z 541,1 → 382,1 et m/z 541,1 → 161 correspondant aux signaux du brodifacoum.

Les valeurs des temps de rétention de chacun des énantiomères du brodifacoum sont, dans les conditions décrites, de :

- t_1 = 15,4 min pour l'énantiomère E_1 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$;
- t_2 = 17,2 min pour l'énantiomère E_2 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$;
- t_3 = 19,9 min pour l'énantiomère E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$, et ;
- t_4 = 26,3 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 susceptibles de varier selon des variations des conditions chromatographiques et notamment avec la température de la colonne de chromatographie. Cependant, dans ces conditions chromatographiques, l'ordre d'élution des stéréo-isomères de

configuration du brodifacoum 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 peut varier entre 15,0 min et 15,7 min, la valeur du temps de rétention (t_2) de l'énantiomère E_2 du diastéréoisomère $D_{2,3}$ peut varier entre 16,9 min et 17,5 min, la valeur du temps de rétention (t_3) de l'énantiomère E_3 du diastéréoisomère $D_{2,3}$ peut varier entre 18,8 min et 20,0 min et la valeur du temps de rétention (t_4) dudit énantiomère E_4 peut varier entre 26,0 min et 27,5 min.

Extraction du brodifacoum des foies de rats gavés avec du brodifacoum

Homogénéisation de l'échantillon de foie

On pèse avec précision de l'ordre de 0,525 g (±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'homogénat 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.

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 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 brodifacoum sur phase solide (« *SPE, Solid Phase Extraction* »)

On fait passer 1 mL de dichlorométhane ($CH_2C\ell_2$), 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 MeOH/H_2O Milli-Q) et contenant le brodifacoum en tête de la cartouche préalablement conditionnée et à raison de 1 goutte toutes les 3 à 4 sec. L'extrait de 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 colonne par aspiration sous vide connectée en partie basse de la cartouche. On dépose ensuite en tête de cartouche 1 mL de solution d'élution formée de dichlorométhane ($CH_2C\ell_2$) et de méthanol (CH_3OH) en proportion volumique de 90/10 et on collecte en bas de cartouche un éluat comprenant le brodifacoum. 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 avec 0,5 mL d'acétonitrile ($NC\text{-}CH_3$) et on filtre la solution d'acétonitrile contenant le brodifacoum sur filtre de porosité 0,2 µm.

Rémanence hépatique des stéréo-isomères (E_1, E_2, E_3 et E_4) de configuration du brodifacoum chez le rat

On administre par voie orale (« *peros* ») 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 solution comprenant du brodifacoum dans un mélange d'huile végétale et de DMSO à 5 % de façon que la quantité de brodifacoum 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.

À 1 jour (J+1), 2 jours (J+2), 5 jours (J+5), 7 jours (J+7) et 9 jours (J+9) après le gavage, on euthanasie 6 rats préalablement anesthésiés à l'isoflurane, on prélève le foie des rats euthanasiés puis on extrait du foie et on

dose les quantités de chacun des énantiomères du brodifacoum présents dans le foie des rats gavés. Les résultats obtenus sur les rats (mâles et femelles) sont donnés au tableau 1 ci-après dans lequel les valeurs de la concentration de chacun des énantiomères du brodifacoum dans le foie sont la moyenne des valeurs mesurées sur 6 rats et exprimées en nanogramme (ng) par gramme de foie.

Concentration hépatique, ng/g	J+1	J+2	J+5	J+7	J+9
Énantiomère E_1	2956,5	2025,5	1487	892	442
Énantiomère E_2	7425	4980	3400	1869,5	1054
Énantiomère E_3	13563,5	8700	8911,5	7762,5	5862,5
Énantiomère E_4	2484,5	1921	1533	1311	860

Tableau 1

La figure 2 représente l'évolution du pourcentage de la quantité massique de chaque énantiomère (E_1 et E_4) du diastéréoisomère $D_{1,4}$ et de chaque énantiomère (E_2 et E_3) du diastéréoisomère $D_{2,3}$ par rapport à la quantité de brodifacoum retenue dans le foie des rats gavés et euthanasiés à J+1, J+2, J+5, J+7 et J+9. Le pourcentage dudit énantiomère E_1 est représenté par des colonnes à hachures obliques, le pourcentage dudit énantiomère E_4 est représenté par des colonnes blanches, le pourcentage dudit énantiomère E_2 est représenté par des colonnes à hachures horizontales et le pourcentage dudit énantiomère E_3 est représenté par des colonnes noires. Les proportions respectives de chacun des énantiomères (E_1 et E_4) du diastéréoisomère $D_{1,4}$ et des énantiomères (E_2 et E_3) du diastéréoisomère $D_{2,3}$ dans le brodifacoum de la composition de gavage sont représentées en colonne « X » figure 2 et sont de 15% pour l'énantiomère E_1 et de 15% pour l'énantiomère E_4 et de 35% pour l'énantiomère E_2 du diastéréoisomère $D_{2,3}$ et de 35% pour l'énantiomère E_3 du diastéréoisomère $D_{2,3}$. Ledit énantiomère E_3 est l'énantiomère du brodifacoum qui est le plus rémanent dans le foie des rats et le plus toxique pour l'environnement.

Rémanence hépatique de l'énantiomères E_4 du diastéréoisomère $D_{1,4}$ du brodifacoum chez le rat mâle et le rat femelle

On procède comme précédemment en analysant séparément la rémanence de l'énantiomère E_4 du brodifacoum dans le foie des rats mâles et dans le foie des rats femelles.

Les résultats obtenus dans le groupe de 3 rats mâles et dans le groupe de 3 rats femelles sont donnés au tableau 2 ci-après dans lequel les valeurs de la concentration de l'énantiomère E_4 du brodifacoum dans le foie des rats mâles et des rats femelles sont la moyenne des valeurs de concentration mesurées sur 3 rats et exprimées en nanogramme (ng) par gramme de foie. Ces résultats sont aussi représentés en figure 3 dans laquelle l'évolution de la concentration de l'énantiomère E_4 du brodifacoum dans le foie des rats mâles est représentée par des colonnes à hachures obliques et l'évolution de la concentration de l'énantiomère E_4 du brodifacoum dans le foie des rats femelles est représentée par des colonnes noires.

Concentration hépatique dudit énantiomère E_4, ng/g	J+1	J+2	J+5	J+7	J+9
Mâles	321	79	131	3	0
Femelles	4648	3763	2935	2619	1720

Tableau 2

La concentration dudit énantiomère E_4 selon l'invention est plus faible, voire nulle, chez les mâles alors qu'elle reste élevée chez les femelles au moins jusqu'à J+9. Un appât rodonticide comprenant majoritairement dudit énantiomère E_4 permet de viser spécifiquement des rongeurs cibles nuisibles femelles, de limiter le nombre de portées de rongeurs cibles nuisibles et de limiter la quantité résiduelle dudit énantiomère E_4 selon l'invention dans le foie des rongeurs cibles nuisibles mâles susceptibles d'être consommé par des prédateurs ou charognards de ces rongeurs cibles nuisibles.

Il va de soi que l'invention peut faire l'objet de nombreuses variantes de réalisation et applications. En particulier, un appât rodonticide et un

procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles sont sujets à des infinités de variantes tant dans la formulation de l'appât rodonticide que dans les modes de mise en œuvre du procédé.

5

REVENDICATIONS

1/ - Appât rodonticide comprenant du brodifacoum et au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles, caractérisé en ce que l'appât rodonticide comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_3, du brodifacoum telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%, ledit énantiomère E_3 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum, un temps de rétention t_3 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$;

t_1, t_2 et t_4 représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit énantiomère E_3, l'analyse chromatographique étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions ci-après :

- 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-méthylbenzoate), 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 de méthanol (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 95/5 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 brodifacoum à une concentration de 1 µg de brodifacoum par millilitre d'acétonitrile.

2/ - Appât selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sensiblement exempt dudit énantiomère E_3.

3/ - Appât selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'il comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_2, du brodifacoum, ledit énantiomère E_2 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée

dans les conditions précitées, un temps de rétention t_2 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$, la quantité dudit énantiomère E_2 étant telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%.

4/ - Appât selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_1, du brodifacoum, ledit énantiomère E_1 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans les conditions précitées, un temps de rétention t_1 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$, la quantité dudit énantiomère E_1 étant telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%.

5/ - Appât selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'il comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_4, du brodifacoum, ledit énantiomère E_4 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans les conditions précitées, un temps de rétention t_4 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$, le rapport de la quantité dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodonticide sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide étant compris entre 30% et 100%.

6/ - Appât selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'excipient comestible comprend au moins un aliment choisi dans le groupe 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.

7/ - Appât selon l'une des revendications 1 ou 6, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité massique de brodifacoum telle que le rapport de cette quantité massique de brodifacoum sur la quantité massique d'appât rodonticide est inférieur à 200 ppm.

8/ - Procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles, dans lequel on dissémine une quantité d'appât rodonticide comprenant du

brodifacoum et au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles, caractérisé en ce que l'appât rodonticide comprend une quantité d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_3, du brodifacoum telle que le rapport de cette quantité sur la quantité de brodifacoum dans l'appât rodonticide est inférieur à 10%, ledit énantiomère E_3 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum, un temps de rétention t_3 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$;

t_1, t_2 et t_4 représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit énantiomère E_3, l'analyse chromatographique étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions ci-après :

- 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-méthylbenzoate), 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 de méthanol (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 95/5 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 brodifacoum à une concentration de 1 µg de brodifacoum par millilitre d'acétonitrile.

9/ - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on choisit en combinaison :

- l'excipient comestible ;
- la quantité dudit énantiomère E_3 ;
- une proportion massique de brodifacoum dans l'appât rodonticide ;
- une quantité d'appât rodonticide disséminé ;

de façon que des rongeurs cibles nuisibles consomment une quantité du brodifacoum suffisante pour être létale pour lesdits rongeurs cibles nuisibles

consommant dudit appât rodonticide au cours d'une période unique de 24 heures consécutives.

10/ - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on choisit en combinaison :

- l'excipient comestible ;
- la quantité dudit énantiomère E_3 ;
- une proportion massique de brodifacoum dans l'appât rodonticide ;
- une quantité d'appât rodonticide disséminé ;

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

o non létale pour des rongeurs cibles nuisibles consommant dudit appât rodonticide pendant une période unique de 24 heures consécutives, et ;

o suffisante pour être létale pour des rongeurs cibles nuisibles consommant dudit appât rodonticide pendant plusieurs périodes de 24 heures, lesdites périodes étant consécutives.

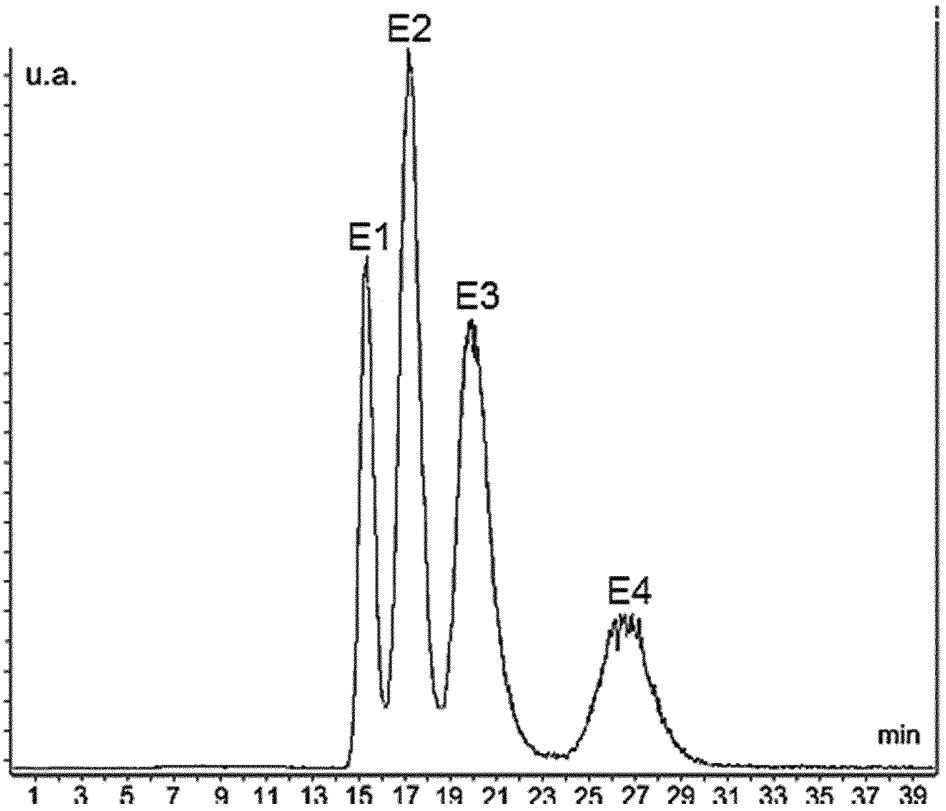

u.a.
E1
E2
E3
E4
min
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39

Fig 1

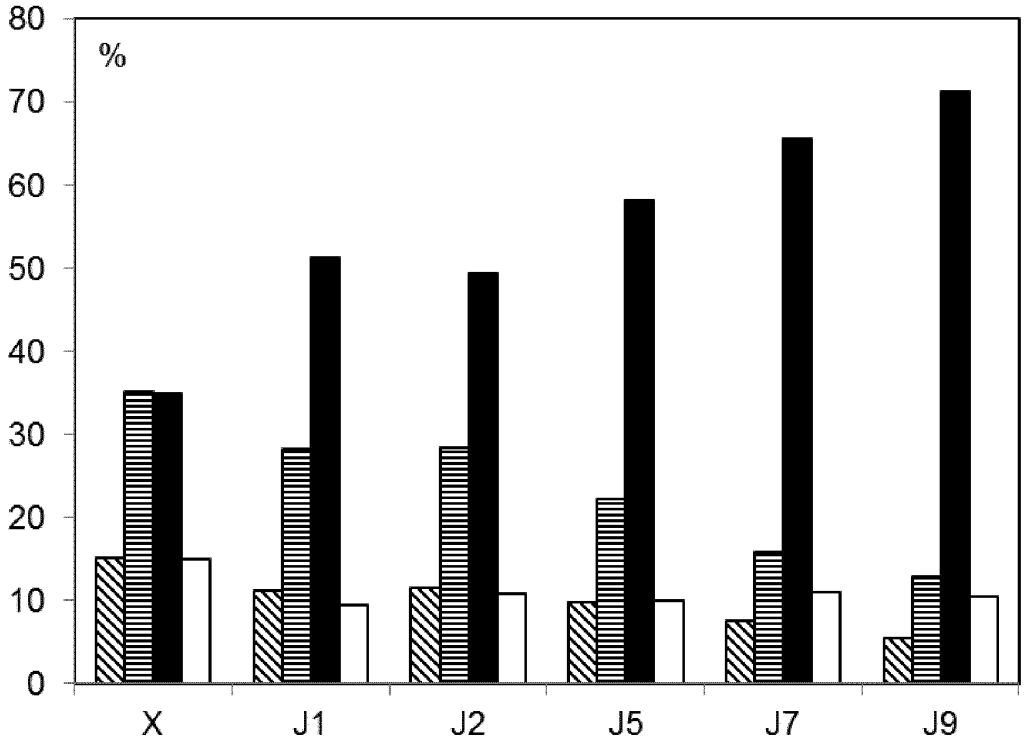

80
70
60
50
40
30
20
10
0
%
X
J1
J2
J5
J7
J9

Fig 2

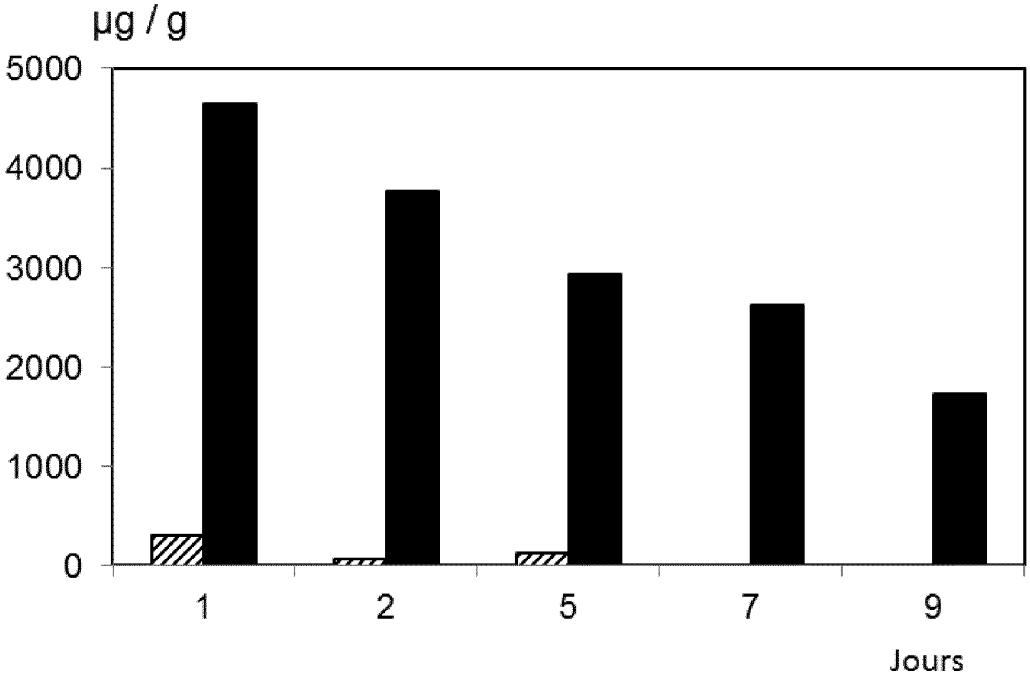


Fig 3

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement national

FA 821839
FR 1562192

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	VAN HEERDEN P S ET AL: "Efficient Asymmetric Synthesis of the Four Diastereomers of Diphenacoum and Brodifacoum", TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 53, no. 17, 1 avril 1997 (1997-04-01), pages 6045-6056, XP004105831, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/S0040-4020(97)00254-8 * tableau 1; composés 2a-2d *	1-5,8	A01N43/16
X	EP 0 147 052 A2 (ICI PLC [GB]) 3 juillet 1985 (1985-07-03) * page 5, ligne 15 - ligne 30; revendications 1-3, 6-10; exemples 1, 3, 6 *	1-3,5-10	
X	WO 96/27598 A1 (IMPLICO BV [NL]; BEZUIDENHOUDT BAREND CHRISTIAA [ZA]) 12 septembre 1996 (1996-09-12) * le tableau de la page 19; revendications 32-35, 49, 50; figure 4/4 *	1-5,8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	ARIENS E J: "STEREOCHEMISTRY: A SOURCE OF PROBLEMS IN MEDICINAL CHEMISTRY", MEDICINAL RESEARCH REVIEWS, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 4, 1 janvier 1986 (1986-01-01), pages 451-466, XP000573748, ISSN: 0198-6325 * chapitre IV.; page 457 - page 462 *	1-10	C07D A01N

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
1 juin 2016	Moriggi, J

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

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

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

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1562192 FA 821839

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 01-06-2016
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
WO 9627598 A1	12-09-1996	AU 1825295 A	23-09-1996
		WO 9627598 A1	12-09-1996

EPO FORM P0465