

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

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

3 044 874

②1 N° d'enregistrement national : **15 62186**

⑤1 Int Cl⁸ : **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 un appât rodenticide comprenant au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles et un stéréoisomère de configuration, dit énantiomère E₄, du brodifacoum, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₄ et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₁, du brodifacoum distinct dudit énantiomère E₄;

○ ledit énantiomère E₄ présentant, par analyse chromatographique du brodifacoum effectuée dans des conditions particulières et à la température de 21,5°C, un temps de rétention t₄;

○ ledit énantiomère E₁ présentant, par analyse chromatographique du brodifacoum effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t_i; les temps de rétention t_i et t₄ étant de valeurs telles que t₁ < t₂ < t₃ < t₄; t₂ et t₃ représentant des temps de rétention de stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄.

FR 3 044 874 - A1



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

L'invention concerne un appât rodenticide comprenant du brodifacoum et un procédé de lutte -notamment de lutte sélective- contre des rongeurs cibles nuisibles. L'invention concerne aussi 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 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 rodenticide 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 produire chez ces animaux domestiques, chez ces animaux de compagnie ou chez des humains un empoisonnement qui peut être létal.

En outre, une fraction du brodifacoum 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 rodenticide. Cette consommation secondaire est susceptible d'entraîner 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 rodenticide comprenant un stéréo-isomère de configuration

du brodifacoum et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui sont en même temps efficaces pour contrôler des 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 ou des humains- consommant accidentellement un tel appât rodenticide.

L'invention vise donc à pallier ces inconvénients en proposant un appât rodenticide comprenant un stéréo-isomère de configuration 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 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 appât rodenticide comprenant un stéréo-isomère de configuration 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 rodenticide comprenant un stéréo-isomère de configuration 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 cibles -notamment des oiseaux, et en particulier des rapaces-

L'invention vise aussi à proposer un appât rodenticide comprenant un stéréo-isomère de configuration du brodifacoum et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui ne nécessitent pas, pour contrôler une population de rongeur cibles nuisibles, d'utiliser un agent rodenticide à forte dose et qui sont respectueux de l'environnement, de la santé humaine et des animaux non cibles -notamment des oiseaux-

L'invention vise aussi à proposer un appât rodenticide comprenant un stéréo-isomère de configuration 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 résistants à des appâts connus de lutte
5 contre des rongeurs cibles nuisibles.

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

Pour ce faire, l'invention concerne un appât rodenticide comprenant :

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

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

○ ledit énantiomère E_4 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans des conditions décrites ci-après et à la température de 21,5°C, un temps de rétention t_4 ;

20 ○ ledit énantiomère E_1 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t_1 ;

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

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

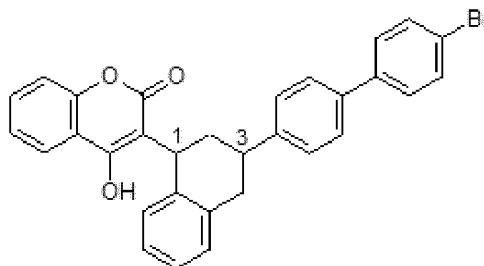
étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 \AA ;

- 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.

10 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 :



15 (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.

20 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) ;

25

- 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 ;
- 5 - 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 ;
- 10 - 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
- 15 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 ;
- 20 - 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.

Les inventeurs ont observé que l'analyse du brodifacoum par chromatographie liquide à haute pression dans les conditions décrites ci-

25 dessus fait apparaître 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

30 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, dit énantiomère E_1

et dit 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
5 sont les énantiomères, dit énantiomère E_2 et dit 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
10 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
15 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'éluion des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum reste inchangé.

20 Les inventeurs ont réalisé une telle séparation des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum 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
25 d'obtenir la quantité dudit énantiomère E_4 recherchée et la pureté souhaitée. Les inventeurs ont obtenu ledit énantiomère E_4 purifié et séparé dudit énantiomère E_1 et séparé de l'énantiomère E_2 et de l'énantiomère E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ du brodifacoum par élimination de la phase mobile de la fraction collectée et contenant ledit énantiomère E_4 . Il est possible de réaliser une telle séparation par
30 chromatographie liquide à haute pression sur colonne chirale préparative, c'est-à-dire sur une colonne chirale de plus grandes dimensions

-notamment de diamètre intérieur supérieur à 2 mm- et dans laquelle la phase stationnaire présente une granulométrie supérieure à 3 μ m.

Il n'était pas connu antérieurement de pouvoir séparer ledit énantiomère E₄ dudit énantiomère E₁ et des énantiomères (E₂ et E₃) du diastéréoisomère D_{2,3} du brodifacoum.

Les inventeurs qui sont parvenus à séparer ledit énantiomère E₄ et ledit énantiomère E₁ et à isoler ledit énantiomère E₄, ont aussi découvert, de façon totalement surprenante et imprévisible, que :

- la rémanence dudit énantiomère E₄ dans le foie de rongeurs cibles nuisibles femelles ayant consommé un tel appât rodenticide selon l'invention est supérieure à la rémanence dudit énantiomère E₄ dans le foie de rongeurs cibles nuisibles mâles ayant consommé un tel appât rodenticide, et que ;

- la rémanence dudit énantiomère E₄ dans le foie de rongeurs cibles nuisibles femelles est suffisante pour être rodenticide au moins 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 E₄ selon l'invention permet la réalisation d'appâts rodenticides présentant une efficacité rodenticide élevée vis-à-vis de rongeurs cibles nuisibles femelles et en limitant le nombre de portées de rongeurs cibles nuisibles tout en limitant la quantité résiduelle dudit énantiomère E₄ selon l'invention dans le foie des rongeurs cibles nuisibles mâles.

Un tel appât rodenticide permet de limiter la quantité de brodifacoum résiduelle dans le foie de rongeurs cibles nuisibles mâles tout en maintenant dans le foie de rongeurs cibles nuisibles femelles une quantité de brodifacoum qui est rodenticide pour lesdites femelles de rongeurs cibles nuisibles. Un tel appât est donc moins toxique pour l'environnement et, en particulier pour des animaux -notamment par 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 rodenticide tout en conservant une activité anticoagulante suffisante, en particulier sur les femelles de rongeurs cibles nuisibles, pour que l'appât soit rodenticide.

5 Il n'est cependant pas exclu que certains rongeurs cibles nuisibles mâles puissent être empoisonnés par consommation élevée et répétée d'appât rodenticide selon l'invention.

Un appât rodenticide selon l'invention comprend donc dudit énantiomère E_4 , à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_4 , et dudit énantiomère E_1 , ledit énantiomère E_4 étant l'énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ qui est le plus retenu (de temps de rétention de plus grande valeur) en chromatographie dans les conditions précitées des deux énantiomères dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et des deux énantiomères E_2 et E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$.

15 L'invention concerne donc aussi un appât rodenticide comprenant dudit énantiomère E_4 , à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_4 , et dudit énantiomère E_1 , c'est-à-dire à l'exclusion d'un mélange dans lequel ledit énantiomère E_4 , et ledit énantiomère E_1 sont en mélange racémique équimoléculaire et non optiquement actif.

20 On dose ledit énantiomère E_4 et ledit énantiomère E_1 de toute composition comprenant du brodifacoum après analyse et séparation par chromatographie liquide 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
25 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_4 et E_1 . Il est aussi possible de doser ledit énantiomère E_4 et ledit énantiomère E_1 de toute composition comprenant du
30 brodifacoum par spectrométrie de masse.

Selon l'invention, il est possible de réaliser un appât rodenticide comprenant des proportions prédéterminées de chacun des stéréoisomères de configuration du brodifacoum -notamment dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁ dudit diastéréoisomère D_{1,4} et des énantiomères E₂ et E₃ dudit diastéréoisomère D_{2,3}- permettant d'optimiser l'efficacité rodenticide de cet appât rodenticide -notamment vis-à-vis des rongeurs cibles nuisibles femelles- et de limiter sa toxicité vis-à-vis de l'environnement.

Avantageusement et selon l'invention, ledit énantiomère E₄ est présent dans l'appât rodenticide en quantité supérieure à la quantité dudit énantiomère E₁ dans l'appât rodenticide. Avantageusement, ledit diastéréoisomère D_{1,4} du brodifacoum est donc majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄ dans l'appât rodenticide. Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention comprend du diastéréoisomère D_{1,4} du brodifacoum majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄.

Dans tout le texte, l'expression « ledit diastéréoisomère D_{1,4} est majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄ » signifie que le rapport de la quantité (massique, molaire ou volumique) dudit énantiomère E₄ sur la quantité (massique, molaire ou volumique correspondante) dudit diastéréoisomère D_{1,4} (sous toutes ses formes énantiomères) est supérieur à 50%.

Ainsi, en particulier dans un appât rodenticide selon l'invention :

- le rapport de la quantité dudit énantiomère E₄ sur la somme des quantités dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁ est supérieur à 0,5 (supérieur à 50 %) ;

- le rapport de la concentration dudit énantiomère E₄ sur la somme de la concentration dudit énantiomère E₄ et de la concentration dudit énantiomère E₁ est supérieur à 0,5 (supérieur à 50 %), et ;

- la proportion dudit énantiomère E₄ dans l'appât rodenticide est supérieure à la proportion de dudit énantiomère E₁ dans l'appât rodenticide.

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide comprend une quantité dudit énantiomère E₄ 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 dans l'appât rodenticide est supérieur à 50%, notamment supérieur à 60%, en particulier supérieur à 70%, plus particulièrement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90%, plus préférentiellement supérieur à 95%,
5 particulièrement 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, l'appât rodenticide comprend 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 dans l'appât rodenticide est supérieur à 75 %, de préférence compris entre 85 % et 100 %, plus préférentiellement compris entre 90 % et 98 %.

Dans un autre mode de réalisation, avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide comprend 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 dans l'appât rodenticide est compris entre 98 % et 100 %.

L'appât rodenticide peut aussi comprendre une quantité dudit énantiomère E_1 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 dans l'appât rodenticide 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 brodifacoum est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodenticide.
25 L'appât rodenticide comprend donc une quantité dudit énantiomère E_4 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide est supérieur au rapport de la quantité dudit énantiomère E_1 sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide, est supérieur au rapport de la quantité dudit énantiomère E_2 sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide et est supérieur au rapport de la quantité dudit énantiomère E_3 sur la
30 quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide.

Ainsi, en particulier, dans un appât rodenticide selon l'invention :

- le rapport de la quantité dudit énantiomère E_4 sur la quantité du brodifacoum est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;
- 5 - le rapport de la quantité dudit énantiomère E_4 sur la somme de la quantité dudit énantiomères E_1 , de la quantité dudit énantiomères E_4 , et de la quantité de chacun des énantiomères E_2 et E_3 du diastéréoisomère $D_{2,3}$ du brodifacoum est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;
- 10 - le rapport de la concentration dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodenticide sur la concentration du brodifacoum dans l'appât rodenticide est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;
- 15 - la proportion dudit énantiomère E_4 dans l'appât rodenticide est supérieure à la proportion de l'énantiomère E_1 dans l'appât rodenticide et supérieure à la proportion de chacun des énantiomères E_2 et E_3 du diastéréoisomère $D_{2,3}$ du brodifacoum dans l'appât rodenticide.

Les inventeurs ont aussi observé qu'un appât selon l'invention comprenant dudit énantiomère E_4 , à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_4 et dudit énantiomère E_1 dans lequel la quantité dudit énantiomère E_4 est différente de la quantité dudit énantiomère E_1 , en
20 particulier dans lequel le brodifacoum est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_4 est susceptible de pouvoir être utilisé pour lutter contre des populations de rongeurs cibles nuisibles résistants à des traitements rodenticides connus.

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide
25 comprend une quantité dudit énantiomère E_4 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide est supérieur à 25%, notamment supérieur à 50%, en particulier supérieur à 70%, plus particulièrement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90%, particulièrement préférentiellement supérieur à 95%, plus préférentiellement
30 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, l'appât rodenticide comprend une quantité dudit énantiomère E_4 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide 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, l'appât rodenticide comprend une quantité dudit énantiomère E_4 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide est compris entre 95 % et 99 %.

Dans un autre mode de réalisation particulier, avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide comprend une quantité dudit énantiomère E_4 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide est supérieur à 95%.

Dans un autre mode de réalisation, avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide comprend une quantité dudit énantiomère E_4 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide est compris entre 98% et 100 % -bornes incluses-.

Dans un autre mode de réalisation particulièrement avantageux selon l'invention, l'appât rodenticide comprend une quantité dudit énantiomère E_4 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide est sensiblement de l'ordre de 100 %.

Un appât rodenticide selon l'invention peut être sensiblement exempt dudit énantiomère E_1 , c'est à dire que ledit énantiomère E_1 peut éventuellement être présent dans l'appât rodenticide mais seulement à l'état de traces. Un appât rodenticide selon l'invention peut aussi être sensiblement exempt dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$, c'est à dire que le diastéréoisomère $D_{2,3}$ peut éventuellement être présent dans l'appât rodenticide mais seulement à l'état de traces. L'appât rodenticide selon l'invention peut aussi être sensiblement exempt de l'énantiomère E_2 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$, c'est à dire que l'énantiomère E_2 peut éventuellement être présent dans l'appât rodenticide mais seulement à l'état

Avantageusement et selon l'invention, l'excipient 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.

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
5 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,
10 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
15 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 brodifacoum et
20 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.
25 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
30 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 brodifacoum, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁. Il peut aussi s'agir d'un appât rodenticide solide comprenant du brodifacoum et dans lequel ledit diastéréoisomère D_{1,4} est majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄. Il peut aussi s'agir d'un appât rodenticide solide comprenant du brodifacoum dans lequel le brodifacoum est majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄.

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide est choisi dans le groupe formé des appâts liquides comprenant du brodifacoum 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 brodifacoum dans un solvant du brodifacoum, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁. Il peut aussi s'agir d'une solution de brodifacoum dans un solvant du brodifacoum et dans lequel ledit diastéréoisomère D_{1,4} est majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄. Il peut aussi s'agir d'une solution de brodifacoum dans un solvant du brodifacoum et dans laquelle le brodifacoum est majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄.

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.

L'invention concerne aussi un appât rodenticide comprenant dudit énantiomère E₄, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁, le brodifacoum de l'appât rodenticide étant optiquement actif. Il n'est cependant pas exclu que le brodifacoum de l'appât rodenticide selon l'invention, comprenant dudit énantiomère E₄, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁, soit lui-même optiquement inactif.

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

Avantageusement, l'appât rodenticide comprend au moins un conservateur apte à assurer sa conservation lors de son stockage. Avantageusement, l'appât rodenticide comprend au moins un composé amérissant 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 rodenticide selon l'invention comprend exclusivement du brodifacoum, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁, à titre de substance rodenticide. En particulier, l'appât rodenticide selon l'invention est exempt de toute autre substance anticoagulante à usage rodenticide distincte du brodifacoum. Cependant, dans cette variante selon l'invention, l'appât rodenticide peut comprendre toute substance anti-nuisible autre qu'un rodenticide, telle qu'une substance insecticide et/ou acaricide.

Avantageusement, dans une autre variante particulière, l'appât rodenticide selon l'invention comprend du brodifacoum à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁ et au moins une autre substance distincte du brodifacoum à titre de substance rodenticide. Cette autre substance rodenticide distincte du brodifacoum peut être une autre substance anticoagulante -notamment du type anti-vitamine K ou non- ou toute autre substance rodenticide non anticoagulante.

L'invention concerne donc aussi un procédé chromatographique de séparation des stéréo-isomères de configuration -notamment dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄ d'un diastéréoisomère, dit diastéréoisomère D_{1,4}, du brodifacoum et, le cas échéant, dudit énantiomère E₂ et dudit énantiomère E₃ d'un autre diastéréoisomère, dit diastéréoisomère D_{2,3}- du brodifacoum. L'invention concerne en particulier un procédé chromatographique d'obtention dudit énantiomère E₄.

L'invention concerne donc un procédé chromatographique de séparation des 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-méthyl-benzoate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de
5 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 ;

10 - 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 dudit énantiomère E₄, puis ;

- on entraîne la composition liquide avec la phase mobile dans la
15 colonne pour chromatographie dans des conditions propres à entraîner une séparation dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄, et on collecte une fraction de la phase mobile comprenant ledit énantiomère E₄ avec un temps de rétention t₄ de valeur telle que t₁ < t₂ < t₃ < t₄ ; t₁, t₂ et t₃ représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit
20 énantiomère E₄, séparément dudit énantiomère E₁, et ;

- on élimine la phase mobile liquide de ladite fraction de façon à obtenir ledit énantiomère E₄.

L'invention vise aussi un stéréo-isomère de configuration -notamment ledit énantiomère E₄- du brodifacoum obtenu par un procédé selon
25 l'invention.

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 comprenant :

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

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

5 ○ ledit énantiomère E_4 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans des conditions décrites ci-après et à la température de 21,5°C, un temps de rétention t_4 ;

10 ○ ledit énantiomère E_1 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t_1 ;

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

15 - 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;

20 - 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 ;

25 - 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 rodenticide selon l'invention, ladite quantité d'appât disséminé étant suffisante

30

pour être rodenticide.

Dans un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, on dissémine un appât rodenticide comprenant dudit énantiomère E₄, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₄ et dudit énantiomère E₁. Dans une variante d'un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, on dissémine un appât rodenticide comprenant une quantité dudit énantiomère E₄ supérieure à la quantité dudit énantiomère E₁. Ledit diastéréoisomère D_{1,4} est donc majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄ dans l'appât rodenticide. Dans une variante d'un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, le brodifacoum est majoritairement sous forme dudit énantiomère E₁.

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

- l'excipient comestible ;
- une quantité dudit énantiomère E₄ distincte de la quantité dudit énantiomère E₁ dans l'appât rodenticide ;
- une proportion dudit énantiomère E₄ par rapport au brodifacoum ;
- une proportion massique de brodifacoum dans l'appât rodenticide, et ;
- une quantité d'appât rodenticide 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 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 brodifacoum dans l'appât rodenticide est inférieure à 200 ppm, notamment comprise entre 2 ppm et 100 ppm, de préférence comprise entre 2 ppm et 50 ppm, plus préférentiellement comprise entre 2 ppm et 25 ppm, encore plus préférentiellement comprise entre 15 ppm et 25 ppm.

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

- l'excipient comestible ;
- une quantité dudit énantiomère E₄ distincte de la quantité dudit énantiomère E₁ dans l'appât rodenticide ;
- une proportion dudit énantiomère E₄ par rapport au brodifacoum ;
- 5 - une proportion massique de brodifacoum dans l'appât rodenticide, et ;
- une quantité d'appât rodenticide disséminé ;

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

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

Avantageusement et selon l'invention, lesdites périodes de

15 24 heures sont 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 rodenticide létale pour des rongeurs cibles nuisibles consommant durablement cet appât rodenticide et généralement non létale pour

20 les rongeurs ou des animaux non cibles 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 pendant une durée de 24 heures peut être insuffisante pour entraîner la mort dudit rongeur, alors qu'une

25 consommation répétée d'appât rodenticide pendant au moins deux jours consécutifs permet d'entraîner 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

30 comprise entre 2 ppm et 15 ppm- par rapport à l'appât rodenticide.

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 rodenticide susceptible d'être ingérée par les rongeurs cibles nuisibles, ladite quantité d'appât rodenticide étant suffisante pour tuer des rongeurs cibles nuisibles 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 brodifacoum dans l'appât rodenticide, la proportion dudit énantiomère E_4 par rapport à la proportion dudit énantiomère E_1 , et la proportion dudit énantiomère E_4 dans le brodifacoum pour que la consommation de l'appât rodenticide soit létale pour des rongeurs cibles nuisibles 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_4 étant supérieure à 95% -notamment de l'ordre de 100%- par rapport au brodifacoum dans l'appât, la proportion massique du brodifacoum par rapport à l'appât rodenticide est comprise entre 2 ppm et 30 ppm -notamment de l'ordre de 15 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, l'appât rodenticide comprenant majoritairement dudit énantiomère E_4 par rapport audit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et par rapport au brodifacoum.

Dans un procédé selon l'invention, on adapte la quantité d'appât rodenticide disséminé, la quantité dudit énantiomère E_4 par rapport à la quantité dudit énantiomère E_1 , la quantité dudit énantiomère E_4 par rapport à la quantité du brodifacoum et la proportion massique du brodifacoum par rapport à l'appât rodenticide de façon à permettre une consommation d'appât rodenticide 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 rodenticide ;

5 - 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.

L'invention concerne également un appât rodenticide comprenant du brodifacoum, un procédé de lutte contre les rongeurs cibles nuisibles et un procédé de séparation des stéréo-isomères de configuration du
10 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 :

15 - 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 en histogramme de la rémanence dudit énantiomère E₄ dans le foie de rats mâles et dans le foie de rats femelles.

Extraction du brodifacoum de foies de rats gavés avec du
20 brodifacoum

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
25 homogénéisateur/disperseur Ultra-Turrax[®] pendant une durée de l'ordre de 30 secondes. 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
30 soumet l'échantillon à une évaporation sous un flux d'azote (N₂) 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 (N₂) 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.

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

On fait passer 1 mL de dichlorométhane (CH₂Cl₂), puis 1 mL de méthanol (CH₃OH), puis 1 mL d'eau ultra-pure (Milli-Q) sur une cartouche Oasis HLB 1cc (WAT094225, Waters). On dépose ensuite en tête de la cartouche préalablement conditionnée l'extrait de foie débarrassé des lipides (1mL CH₃OH/H₂O Milli-Q) et contenant le brodifacoum. 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 (CH₃OH) et d'eau ultra-pure (H₂O) 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 formée de dichlorométhane (CH₂Cl₂) et de méthanol (CH₃OH) 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 (N₂) à la température de 40°C. On reprend l'échantillon dans avec 0,5 mL d'acétonitrile (NC-CH₃) et on filtre la solution d'acétonitrile contenant le brodifacoum sur filtre de porosité 0,2 µm.

Analyse des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum

On sépare les énantiomères des diastéréoisomères du brodifacoum dans les extraits de foie. On réalise une telle séparation des énantiomères des diastéréoisomères 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 contenant 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 521,1 → 78,9 et m/z 521,1 → 135,1 correspondant aux signaux du brodifacoum. Le chromatogramme obtenu est représenté en figure 1 à titre d'exemple.

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

- $t_1 = 15,4$ min pour ledit énantiomère E_1 ;
- $t_2 = 17,2$ min pour l'énantiomère E_2 du diastéréoisomère $D_{2,3}$;
- $t_3 = 19,9$ min pour l'énantiomère E_3 du diastéréoisomère $D_{2,3}$, et ;
- $t_4 = 26,3$ min pour ledit énantiomère E_4 selon l'invention.

Les valeurs des temps de rétention t_1 , t_2 , t_3 et t_4 sont susceptibles de varier selon les conditions chromatographiques et 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. À 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 dudit 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 dudit 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.

Rémanence hépatique des stéréo-isomères 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 3,4 mg de brodifacoum 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 l'expérience.

Le rapport de la quantité dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ sur la quantité de brodifacoum dans la solution de gavage comprenant du brodifacoum est de 70% et le rapport de la quantité dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ sur la quantité de brodifacoum dans la solution de gavage comprenant du brodifacoum est de 30%.

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 3 rats mâles et trois rats femelles 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 des diastéréoisomères 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 3 rats et exprimées en nanogramme (ng) par gramme de foie. Ces résultats sont représentés en figure 2.

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 1

Compte tenu des proportions respectives dudit diastéréoisomère D_{2,3} (70%) et dudit diastéréoisomère D_{1,4} (30%) dans la solution de gavage, la proportion dudit énantiomère E₄ selon l'invention dans la solution de gavage est de l'ordre de 15%.

La concentration dudit énantiomère E₄ 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 rodenticide comprenant majoritairement dudit énantiomère E₄ 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 E₄ 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 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.

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

2/ - Appât selon la revendication 1, caractérisé en ce que
5 ledit énantiomère E₄ est présent dans l'appât rodenticide en quantité supérieure à la quantité dudit énantiomère E₁ dans l'appât rodenticide.

3/ - Appât selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le brodifacoum est majoritairement sous forme dudit énantiomère E₄ dans l'appât rodenticide.

10 4/ - Appât selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité dudit énantiomère E₄ telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide est supérieur à 25%.

15 5/ - Appât selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité dudit énantiomère E₄ telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du brodifacoum dans l'appât rodenticide est supérieur à 95%.

20 6/ - Appât selon l'une des revendications 1 à 5, 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 est inférieur à 200 ppm.

25 7/ - Appât selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il 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, par exemple des graines de luzerne.

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

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

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

5 ○ ledit énantiomère E₄ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans des conditions décrites ci-après et à la température de 21,5°C, un temps de rétention t₄ ;

10 ○ ledit énantiomère E₁ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de brodifacoum comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du brodifacoum effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t₁ ;

les temps de rétention t₁ et t₄ étant de valeurs telles que t₁ < t₂ < t₃ < t₄ ; t₂ et t₃ représentant des temps de rétention de stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄, ladite analyse étant effectuée :

15 ○ 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 ;

20 ○ 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 ;

25 ○ 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 ;

- une quantité dudit énantiomère E_4 distincte de la quantité dudit énantiomère E_1 dans l'appât rodenticide ;
 - une proportion dudit énantiomère E_4 par rapport au brodifacoum ;
 - une proportion massique de brodifacoum dans l'appât rodenticide, et ;
- 5 - une quantité d'appât rodenticide 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 rodenticide au cours d'une période unique de 24 heures consécutives
- 10 10/ - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on choisit en combinaison :
- l'excipient comestible ;
 - une quantité dudit énantiomère E_4 distincte de la quantité dudit énantiomère E_1 dans l'appât rodenticide ;
- 15 - une proportion dudit énantiomère E_4 par rapport au brodifacoum ;
- une proportion massique de brodifacoum dans l'appât rodenticide, et ;
 - une quantité d'appât rodenticide disséminé ;
- de façon que des rongeurs cibles nuisibles consomment une quantité du brodifacoum ;
- 20 ○ non létale pour des rongeurs cibles nuisibles consommant dudit appât rodenticide pendant une période de 24 heures consécutives, et ;
- suffisante pour être létale pour des rongeurs cibles nuisibles consommant dudit appât rodenticide pendant plusieurs périodes de 24 heures.
- 25 11/ - Procédé chromatographique d'obtention dudit énantiomère E_4 d'un appât rodenticide selon l'une des revendications 1 à 7, 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
- 30 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 contenant 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 ;
- 5
- 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 contenant dudit énantiomère E₄, puis ;
 - on entraîne la composition liquide avec la phase mobile dans la
- 10
- colonne pour chromatographie dans des conditions propres à entraîner une séparation dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄, et on collecte une fraction de la phase mobile contenant ledit énantiomère E₄ avec un temps de rétention t₄ de valeur telle que t₁ < t₂ < t₃ < t₄; t₁, t₂ et t₃ représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du brodifacoum distincts dudit
- 15
- énantiomère E₄, séparément dudit énantiomère E₁, et ;
- on élimine la phase mobile liquide de ladite fraction de façon à obtenir ledit énantiomère E₄.

1 / 1

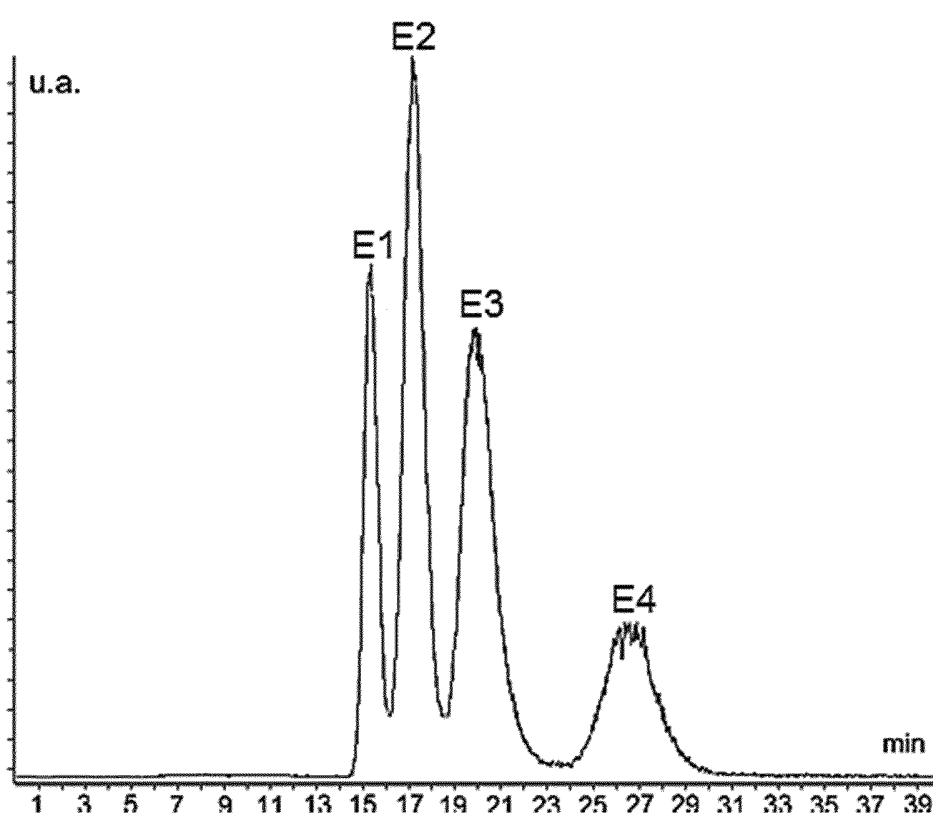


Fig 1

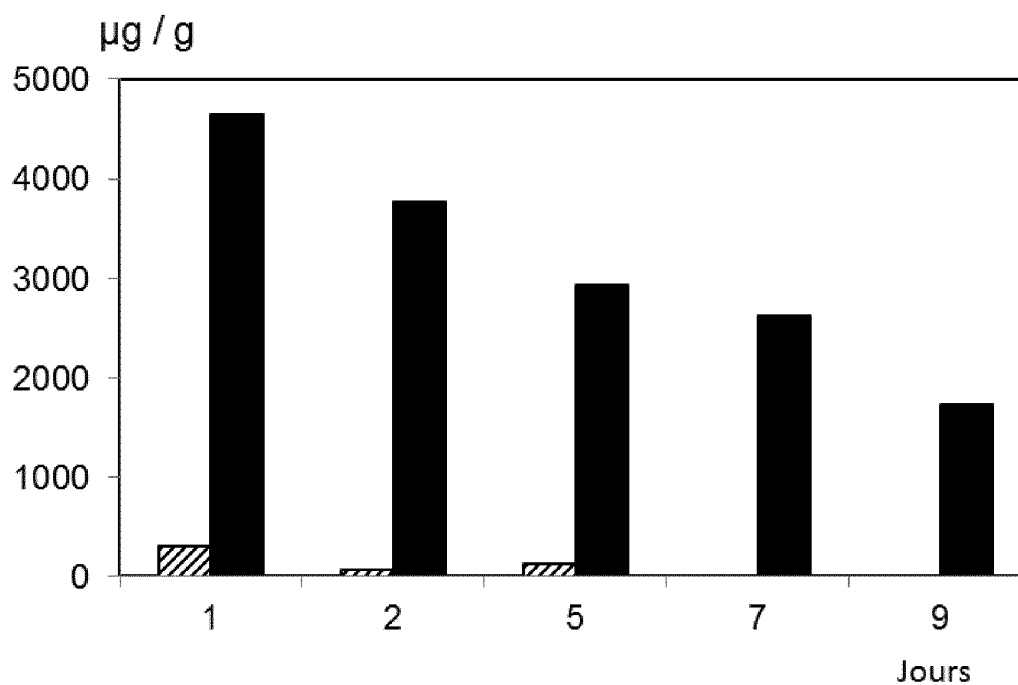


Fig 2

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 819835
FR 1562186

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,D	EP 0 147 052 A2 (ICI PLC [GB]) 3 juillet 1985 (1985-07-03) * revendications 1-3, 6-10; exemples 5,6 *	1-11	A01N43/16
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 * Quatre stéréoisomères de brodifacoum; page 6048 - page 6050; composés 2a-d *	1-11	
E	WO 2015/189320 A1 (LIPHATECH [FR]) 17 décembre 2015 (2015-12-17) * revendications 1-10 *	1-11	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			C07D A01N A01P
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		9 mai 2016	Sotoca Usina, E
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			

1

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1562186 FA 819835**

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 09-05-2016

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 2015189320	A1	17-12-2015	FR 3022110 A1	18-12-2015
			WO 2015189320 A1	17-12-2015
-----	-----	-----	-----	