

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

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

②② Date de dépôt : 11.12.15.

③③ Priorité :

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension : Polynésie-Fr

⑦① Demandeur(s) : LIPHATECH Société par actions simplifiée —FR et

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

④⑤ Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 12.04.19 Bulletin 19/15.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

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.



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

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

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

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

En outre, une fraction du flocoumafène de ces appâts
rodenticides peut être ingérée (consommation secondaire) par des animaux
-notamment par des oiseaux- prédateurs ou charognards de rongeurs nuisibles et
notamment de rongeurs cibles nuisibles affaiblis ayant consommé un tel appât
25 rodenticide. Cette consommation secondaire est susceptible d'entraîner à terme
la mort 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 stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, une composition
30 et un appât rodenticide comprenant un tel stéréo-isomère de configuration et un
procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui sont en même temps

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

5 L'invention vise aussi à pallier ces inconvénients en proposant un stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, une composition et un appât rodenticide comprenant un tel stéréo-isomère de configuration et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles qui sont en même temps efficaces pour contrôler les populations de rongeurs cibles nuisibles et qui
10 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 cadavres de rongeurs cibles nuisibles empoisonnés.

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

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

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

L'invention vise donc aussi à proposer une alternative à des

substances et appâts rodenticides connus.

Pour ce faire, l'invention concerne un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_2 , du flocoumafène, ledit énantiomère E_2 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène
 5 comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t_2 de valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$;

t_1 , t_3 et t_4 représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_2 , l'analyse chromatographique
 10 étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

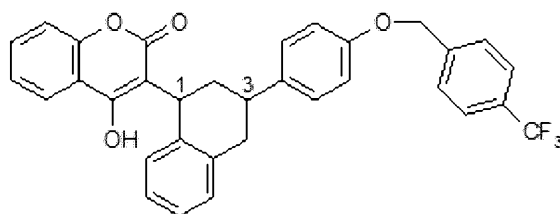
- sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille
 15 moyenne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

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

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

Dans tout le texte :

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



(I) ;

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

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

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

- le terme « sensiblement » indique, de façon habituelle, qu'une caractéristique 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 la colonne de chromatographie.

L'invention concerne donc ledit énantiomère E_2 à l'état isolé et qui présente la propriété de pouvoir être élué, dans les conditions de chromatographie décrites ci-dessus, le deuxième par rapport aux quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène.

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

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

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

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

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

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 énantiomères du flocoumafène reste inchangé.

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

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

Il n'était pas connu antérieurement de méthode pour séparer les énantiomères dudit diastéréoisomère D_{2,3} du flocoumafène. Dans ces conditions expérimentales, les énantiomères (E₂ et E₃) dudit diastéréoisomère D_{2,3} sont séparés et purifiés par chromatographie liquide à haute pression. Dans ces conditions chromatographiques, on sépare aussi les énantiomères (E₁ et E₄) dudit diastéréoisomère D_{1,4} du flocoumafène.

L'invention concerne donc ledit énantiomère E₂ dudit

diastéréoisomère $D_{2,3}$ qui est le moins retenu (de temps de rétention le plus court) des deux énantiomères dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ séparés par chromatographie dans les conditions précitées.

L'invention concerne donc ledit énantiomère E_2 séparé de
 5 l'énantiomère E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ et séparé de l'énantiomère E_1 et de l'énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$.

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

L'invention concerne donc un tel procédé chromatographique d'obtention dudit énantiomère E_2 selon l'invention, dans lequel :

- 15 - on choisit une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;
- 20 - on choisit, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;
- on réalise une séparation des stéréo-isomères de configuration du
 25 flocoumafène à température ambiante lors de laquelle ;
- on introduit en tête de la colonne pour chromatographie une composition liquide comprenant dudit énantiomère E_2 , puis ;
- on entraîne la composition liquide avec la phase mobile dans la
 colonne pour chromatographie dans des conditions propres à séparer les
 30 stéréo-isomères de configuration du flocoumafène, et on collecte une fraction de la phase mobile comprenant ledit énantiomère E_2 avec un temps de rétention t_2 de

valeur telle que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_1 , t_3 et t_4 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_2 , séparément dudit énantiomère E_3 de temps de rétention t_3 , et ;

- on élimine la phase mobile liquide de ladite fraction de façon à
5 obtenir ledit énantiomère E_2 .

L'invention concerne aussi ledit énantiomère E_2 obtenu par un procédé selon l'invention.

- L'invention concerne aussi une composition comprenant dudit énantiomère E_2 selon l'invention, à l'exclusion d'un mélange racémique
10 dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 . L'invention concerne donc une composition comprenant dudit énantiomère E_2 selon l'invention, à l'exclusion d'un mélange racémique des deux énantiomères E_2 et E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$.

- L'invention concerne donc une composition comprenant un
15 stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_2 , du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_2 et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E_3 , du flocoumafène ;

- ledit énantiomère E_2 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de
20 configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t_2 ;

- ledit énantiomère E_3 présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de
25 configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t_3 ;

- t_2 et t_3 étant de valeurs telles que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_1 et t_4 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 , l'analyse chromatographique étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les
30 conditions suivantes :

- sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;
- en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;
- par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 μL de composition de flocoumafène à une concentration de 1 μg de flocoumafène par millilitre d'acétonitrile.

L'invention concerne donc une telle composition comprenant dudit énantiomère E_2 , à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 , c'est-à-dire à l'exclusion d'une composition dans laquelle ledit énantiomère E_2 et ledit énantiomère E_3 sont en mélange équimoléculaire et non optiquement actif.

On dose ledit énantiomère E_2 et ledit énantiomère E_3 de toute composition comprenant du flocoumafène par analyse et séparation par chromatographie en utilisant une phase stationnaire chirale et une phase mobile liquide telles que décrites ci-dessus pour l'analyse des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène, en réalisant une détection quantitative des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène en sortie de colonne séparative, par exemple par photométrie ou spectrophotométrie d'absorption, en ajustant la concentration en flocoumafène et le volume d'injection aux fins d'obtenir une détection optimale et en mesurant la valeur de l'aire sous le pic de chaque énantiomère E_2 et E_3 . Il est aussi possible de doser ledit énantiomère E_2 et ledit énantiomère E_3 de toute composition comprenant du flocoumafène en réalisant une détection par spectrométrie de masse en sortie de colonne séparative.

Avantageusement et selon l'invention, la quantité dudit

énantiomère E_2 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_3 dans la composition. Dans la composition ledit diastéréoisomère $D_{2,3}$ est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 . La composition selon l'invention comprend dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 .

5 Dans tout le texte, l'expression « ledit diastéréoisomère $D_{2,3}$ est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 » signifie que le rapport de la quantité (massique, molaire ou volumique) dudit énantiomère E_2 sur la quantité (massique, molaire ou volumique correspondante) dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ (sous toutes ses formes énantiomères) est supérieur à 50%.

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

- le rapport de la quantité dudit énantiomère E_2 sur la somme de la quantité dudit énantiomère E_2 et de la quantité dudit énantiomère E_3 est supérieur à 0,5 (supérieur à 50 %) ;

15 - le rapport de la concentration dudit énantiomère E_2 sur la somme de la concentration dudit énantiomère E_2 et de la concentration dudit énantiomère E_3 est supérieur à 0,5 (supérieur à 50 %), et ;

- la proportion dudit énantiomère E_2 dans la composition est supérieure à la proportion dudit énantiomère E_3 dans la composition.

20 Avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la somme de la quantité dudit énantiomère E_2 et de la quantité dudit énantiomère E_3 présents dans la composition 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%,
 25 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, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_2
 30 telle que le rapport de cette quantité sur la somme de la quantité dudit énantiomère E_2 et de la quantité dudit énantiomère E_3 présents dans la

composition 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, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la somme de la quantité dudit énantiomère E_2 et de la quantité dudit énantiomère E_3 présents dans la composition est compris entre 98 % et 100 %.

La composition peut aussi comprendre une quantité dudit énantiomère E_3 telle que le rapport de cette quantité sur la somme de la quantité dudit énantiomère E_2 et de la quantité dudit énantiomère E_3 est inférieur à 50 %, notamment inférieur à 25 %, préférentiellement compris entre 0 % et 25 %, en particulier inférieur à 10 %.

Avantageusement et selon l'invention, le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 dans la composition. La composition comprend donc une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur au rapport de la quantité dudit énantiomère E_3 sur la quantité du flocoumafène dans la composition et supérieur au rapport de la quantité de chaque énantiomère (E_1 et E_4) dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ sur la quantité du flocoumafène dans la composition.

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

- le rapport de la quantité dudit énantiomère E_2 sur la quantité du flocoumafène est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;
- le rapport de la quantité dudit énantiomère E_2 sur la somme des quantités de chaque énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et des quantités de chaque énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;
- le rapport de la concentration dudit énantiomère E_2 dans la composition sur la concentration du flocoumafène dans la composition est supérieur à 0,25 (supérieur à 25 %) ;

- la proportion dudit énantiomère E_2 dans la composition est supérieure à la proportion de chaque énantiomère dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ dans la composition et à la proportion dudit énantiomère E_3 dans la composition.

Avantageusement et selon l'invention, la composition
5 comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur à 25%, notamment supérieur à 50%, en particulier supérieur à 70%, plus particulièrement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90%, particulièrement préférentiellement supérieur à 95%, plus préférentiellement
10 supérieur à 98%, encore plus préférentiellement supérieur à 99% ou de l'ordre de 100%.

Dans un mode particulier de réalisation, avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la
15 composition est supérieur à 70 %, de préférence compris entre 80 % et 100 %, plus préférentiellement compris entre 90 % et 100 %.

Dans un autre mode de réalisation, avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la
20 composition est compris entre 95 % et 99 %.

Dans un autre mode de réalisation particulier, avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur à 95%.

25 Dans un autre mode de réalisation, avantageusement et selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est compris entre 98% et 100 % -bornes incluses-.

Dans un autre mode de réalisation particulièrement
30 avantageux selon l'invention, la composition comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du

flocoumafène dans la composition est sensiblement de l'ordre de 100 %.

Une composition selon l'invention peut être sensiblement exempte dudit énantiomère E_3 , c'est à dire que ledit énantiomère E_3 peut éventuellement être présent dans la composition mais seulement à l'état de traces. Une composition selon l'invention peut aussi être sensiblement exempte dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$, c'est à dire que ledit diastéréoisomère $D_{1,4}$ peut éventuellement être présent dans la composition mais seulement à l'état de traces.

Avantageusement et selon l'invention, la composition est à l'état liquide et comprend un solvant liquide du flocoumafène. Il peut s'agir d'une solution de flocoumafène dans un solvant du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 . Il peut aussi s'agir d'une solution comprenant du flocoumafène dans un solvant du flocoumafène et dans laquelle la quantité dudit énantiomère E_2 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_3 . Il peut aussi s'agir d'une solution comprenant du flocoumafène dans un solvant du flocoumafène et dans laquelle le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 .

Avantageusement et selon l'invention, la composition est à l'état solide. Il peut aussi s'agir d'un solide comprenant du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 . Il peut aussi s'agir d'un solide comprenant du flocoumafène et dans lequel la quantité dudit énantiomère E_2 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_3 . Il peut aussi s'agir d'un solide comprenant du flocoumafène et dans lequel le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 .

L'invention concerne donc aussi une composition selon l'invention comprenant du flocoumafène, ledit diastéréoisomère $D_{2,3}$ du flocoumafène de la composition étant optiquement actif. Il n'est cependant pas exclu que le flocoumafène de la composition selon l'invention soit optiquement inactif.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'une composition selon l'invention pour la préparation d'un appât rodenticide pour des rongeurs

cibles nuisibles.

L'invention concerne aussi un appât rodenticide comprenant une composition selon l'invention, et au moins un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles.

5 Un appât rodenticide selon l'invention comprend :

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

- un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₂, du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₂ et
10 d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₃, du flocoumafène ;

○ ledit énantiomère E₂ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t₂ ;

15 ○ ledit énantiomère E₃ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t₃ ;

t₂ et t₃ étant de valeurs telles que t₁ < t₂ < t₃ < t₄ ; t₁ et t₄ représentant les temps de
20 rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E₂ et dudit énantiomère E₃, ladite analyse étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

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

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

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

Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention
5 comprend un excipient comestible pour des rongeurs cibles nuisibles et du flocoumafène dans lequel la quantité dudit énantiomère E_2 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_3 . Avantageusement, il peut aussi s'agir d'un appât rodenticide comprenant du flocoumafène et dans lequel le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 .

10 Les inventeurs qui sont parvenus à séparer les énantiomères du flocoumafène et à isoler ledit énantiomère E_2 , ont aussi découvert, de façon totalement surprenante et imprévisible, que les stéréo-isomères de configuration du flocoumafène ne présentent pas tous la même rémanence dans le foie de rongeurs consommant du flocoumafène et que ledit énantiomère E_2 présente en
15 fait une rémanence dans le foie de rongeurs consommant un appât rodenticide selon l'invention qui est inférieure à la rémanence de l'énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$, mais aussi inférieure à la rémanence hépatique du flocoumafène.

Ils ont observé que ledit énantiomère E_2 , lorsqu'il est
20 ingéré par un rongeur cible nuisible, est moins rémanent et disparaît du foie du rongeur cible nuisible ayant consommé un appât selon l'invention plus rapidement que ne disparaît l'énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et que ne disparaît le flocoumafène, la quantité dudit énantiomère E_2 étant cependant rodenticide.

25 Les inventeurs ont observé que ledit énantiomère E_2 , bien que présentant une rémanence dans le foie de rongeurs cibles nuisibles plus faible que la rémanence de l'énantiomère E_4 et plus faible que la rémanence du flocoumafène, permet en fait, et de façon totalement inexplicée à ce jour, de lutter efficacement contre des rongeurs cibles nuisibles.

30 La quantité dudit énantiomère E_2 résiduelle dans l'organisme d'un rongeur empoisonné par un appât rodenticide selon l'invention

diminue plus rapidement que la quantité de l'énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$ et que la quantité du flocoumafène. Le rongeur cible nuisible mort ou vif ayant ingéré ledit énantiomère E_2 est de ce fait moins dangereux vis-à-vis de mammifères non-rongeurs et d'oiseaux consommant le rongeur cible nuisible -mort ou vif- et en particulier vis-à-vis de prédateurs (notamment de mammifères non-rongeurs et d'oiseaux) qui consomment préférentiellement les viscères de leurs proies et en particulier leur foie. Ledit énantiomère E_2 est donc peu toxique pour l'environnement.

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

Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention comprend une quantité massique de flocoumafène telle que le rapport de cette quantité massique de flocoumafène sur la quantité massique d'appât rodenticide est inférieur à 200 ppm -c'est-à-dire inférieure à 200 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide-. Avantageusement, il comprend une quantité massique de flocoumafène telle que le rapport de cette quantité massique de flocoumafène sur la quantité massique d'appât rodenticide est supérieur à 1 ppm. Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention comprend une quantité massique de flocoumafène telle que le rapport de cette quantité massique de flocoumafène sur la quantité massique d'appât rodenticide est compris entre 1 ppm et 200 ppm (1 mg à 200 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide). Avantageusement, le rapport de cette quantité massique de flocoumafène sur la quantité massique d'appât rodenticide est compris entre 1 ppm et 100 ppm (1 mg à 100 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide), notamment compris entre 1 ppm et 50 ppm (1 mg à 50 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide), de préférence compris entre 10 ppm et 25 ppm (10 mg à 25 mg de flocoumafène par kilogramme d'appât rodenticide).

Avantageusement, un appât rodenticide selon l'invention comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité

sur la quantité du flocoumafène dans l'appât rodenticide est supérieur à 70%, plus particulièrement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90%, particulièrement préférentiellement supérieur à 95%, plus préférentiellement supérieur à 98%, encore plus préférentiellement supérieur à 99% ou de l'ordre de
 5 100%, et du flocoumafène en proportion massique inférieure à 100 ppm -notamment inférieure à 50 ppm- par rapport à l'appât rodenticide.

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.
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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 inversé), ou d'un sirop de sucre de betterave, ou d'un sirop d'érable ou d'un sirop de canne à sucre, ou d'un sirop obtenu à partir d'une plante du genre *stevia*.

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

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

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

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

Avantageusement, l'appât rodenticide solide selon l'invention peut se présenter sous forme d'un bloc rigide, d'un bloc semi-rigide, d'une mousse, d'une poudre ou d'un gel.

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

Il peut s'agir d'un appât rodenticide solide comprenant du
 flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E_2 et
 10 dudit énantiomère E_3 . Il peut aussi s'agir d'un appât rodenticide solide comprenant du flocoumafène et dans lequel la quantité dudit énantiomère E_2 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_3 . Il peut aussi s'agir d'un appât rodenticide solide comprenant du flocoumafène dans lequel le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 .

Avantageusement et selon l'invention, l'appât rodenticide
 15 est choisi dans le groupe formé des appâts liquides comprenant du flocoumafène et un excipient comestible liquide. L'appât rodenticide est alors une boisson pour des rongeurs cibles nuisibles. Il peut s'agir d'une solution de flocoumafène dans un solvant du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit
 20 énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 . Il peut aussi s'agir d'une solution de flocoumafène dans un solvant du flocoumafène et dans laquelle la quantité dudit énantiomère E_2 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_3 . Il peut aussi s'agir d'une solution de flocoumafène dans un solvant du flocoumafène et dans laquelle le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 .

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

L'invention concerne donc aussi un appât rodenticide
 comprenant dudit énantiomère E_2 , à l'exclusion d'un mélange racémique dudit
 30 énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 , le flocoumafène de l'appât rodenticide étant optiquement actif. Il n'est cependant pas exclu que le flocoumafène de

l'appât rodenticide selon l'invention, comprenant dudit énantiomère E₂, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₂ et dudit énantiomère E₃, soit optiquement inactif.

Avantageusement, l'appât rodenticide comprend au moins
5 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.
10 Avantageusement, l'appât rodenticide 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, la
15 composition et l'appât rodenticide selon l'invention comprennent exclusivement du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique des énantiomères dudit diastéréoisomère D_{2,3}, à titre de substance rodenticide. En particulier, la composition et l'appât rodenticide selon l'invention sont exempts de toute autre substance anticoagulante à usage rodenticide distincte du flocoumafène.
20 Cependant, dans cette variante selon l'invention, la composition et l'appât rodenticide peuvent comprendre toute substance anti-nuisible autre qu'un rodenticide, telle qu'une substance insecticide et/ou acaricide.

Avantageusement, dans une autre variante particulière, la
composition et l'appât rodenticide selon l'invention comprennent du
25 flocoumafène à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₂ et dudit énantiomère E₃ et au moins une autre substance distincte du flocoumafène à titre de substance rodenticide. Cette autre substance rodenticide distincte du flocoumafène peut être une autre substance anticoagulante -notamment du type anti-vitamine K ou non- ou toute autre substance rodenticide non
30 anticoagulante.

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

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

 - un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₂, du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₂ et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₃, du flocoumafène ;

10 ○ ledit énantiomère E₂ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t₂ ;

15 ○ ledit énantiomère E₃ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t₃ ;

20 t₂ et t₃ étant de valeurs telles que t₁ < t₂ < t₃ < t₄ ; t₁ et t₄ représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E₂ et dudit énantiomère E₃, ladite analyse étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

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

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

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

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

Dans un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, la quantité dudit énantiomère E_2 dans l'appât rodenticide est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_3 dans l'appât rodenticide. Ledit diastéréoisomère $D_{2,3}$ est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 . Dans un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_2 .

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

- l'excipient comestible ;
- une quantité dudit énantiomère E_2 distincte de la quantité dudit énantiomère E_3 dans l'appât rodenticide ;
- une proportion dudit énantiomère E_2 par rapport au flocoumafène ;
- une proportion massique de flocoumafène dans l'appât rodenticide, et ;
- une quantité d'appât rodenticide disséminé ;

de façon que des rongeurs cibles nuisibles consomment une quantité du flocoumafène 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 flocoumafène dans l'appât rodenticide est inférieure à 200 ppm, notamment comprise entre 2 ppm et 200 ppm, de préférence comprise entre 2 et 100 ppm,

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

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

- 5 - l'excipient comestible ;
- une quantité dudit énantiomère E₂ distincte de la quantité dudit énantiomère E₃ dans l'appât rodenticide ;
- une proportion dudit énantiomère E₂ par rapport au flocoumafène ;
- une proportion massique de flocoumafène dans l'appât rodenticide, et ;
- 10 - une quantité d'appât rodenticide disséminé ;

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

- non létale pour des rongeurs cibles nuisibles, c'est-à-dire généralement non létale pour les rongeurs cibles nuisibles, consommant dudit appât rodenticide
- 15 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, lesdites périodes étant consécutives.

Cette autre variante de l'invention vise donc aussi un

20 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 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,

25 « *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 est insuffisante pour entraîner la mort dudit rongeur, alors qu'une consommation répétée d'appât rodenticide pendant au moins deux jours consécutifs permet d'entraîner la mort du rongeur cible nuisible.

30 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.

5 Avantageusement, dans cette autre variante d'un procédé selon l'invention, on adapte la quantité d'appât rodenticide disséminé, la proportion massique du flocoumafène dans l'appât rodenticide et la proportion dudit énantiomère E_2 par rapport audit diastéréoisomère $D_{2,3}$ pour que la consommation de l'appât rodenticide soit létale pour des rongeurs cibles
10 nuisibles consommant quotidiennement de l'appât rodenticide pendant au moins 2 périodes de 24 heures -notamment de 3 à 7 périodes-, lesdites périodes étant consécutives.

 Avantageusement, dans cette autre variante d'un procédé selon l'invention, la proportion dudit énantiomère E_2 étant supérieure à 95%
15 -notamment de l'ordre de 100%- par rapport au flocoumafène dans l'appât rodenticide, la proportion massique du flocoumafène par rapport à l'appât rodenticide est comprise entre 2 ppm et 100 ppm, notamment comprise entre 2 et 50 ppm, en particulier comprise entre 2 ppm et 15 ppm -notamment de l'ordre de 10 ppm-.

20 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, ledit appât rodenticide comprenant majoritairement dudit énantiomère E_2 par rapport audit diastéréoisomère $D_{2,3}$ et par rapport au flocoumafène.

25 Dans un procédé selon l'invention, on adapte la quantité d'appât rodenticide disséminé, le rapport de la quantité dudit énantiomère E_2 sur la quantité dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$, le rapport de la quantité dudit énantiomère E_2 sur la quantité du flocoumafène et la proportion massique du flocoumafène par rapport à l'appât rodenticide de façon à permettre une
30 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 stéréo-isomère de configuration du flocoumafène, un procédé d'obtention de cet stéréo-isomère de configuration, une composition et un appât rodenticide et un procédé de lutte
10 contre les rongeurs cibles nuisibles caractérisés en combinaison par tout ou partie des caractéristiques mentionnées ci-dessus ou ci-après.

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

15 - la figure 1 est un chromatogramme représentatif de la séparation des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène sur une colonne chirale ;
- la figure 2 est une représentation en histogramme de la rémanence des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène dans le foie de rats.

20 Analyse des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène

On sépare les stéréo-isomères de configuration du flocoumafène par chromatographie liquide à haute pression en utilisant une colonne chirale LUX[®] Cellulose-4 (00F-4490-B0, phenomenex, Le Pecq, France) à titre de phase stationnaire et un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau
25 comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 à titre de phase mobile avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min. On injecte 1 µL d'extrait à analyser à une concentration de 1 µg/mL d'acétonitrile. La détection est effectuée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) en mode d'ionisation négative
30 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 analyse les transitions MRM (« *Multiple Reaction Monitoring* » m/z 541,1 $\rightarrow$ 382,1 et m/z 541,1 $\rightarrow$ 161 correspondants au signal du flocoumafène.

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

- $t_1 = 4,5$ min pour l'énantiomère E_1 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$;
- $t_2 = 6,2$ min pour ledit énantiomère E_2 selon l'invention ;
- $t_3 = 6,8$ min pour ledit énantiomère E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$, et ;
- $t_4 = 9,3$ min pour l'énantiomère E_4 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$.

10 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 énantiomères du flocoumafène reste inchangé. Á titre indicatif, la valeur du temps de rétention (t_1) de l'énantiomère E_1 dudit diastéréoisomère $D_{1,4}$
15 peut varier entre 4,4 min et 4,6 min. La valeur du temps de rétention (t_2) de l'énantiomère E_2 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ peut varier entre 5,9 min et 6,4 min. La valeur du temps de rétention (t_3) de l'énantiomère E_3 dudit diastéréoisomère $D_{2,3}$ peut varier entre 6,4 min et 6,9 min. La valeur du temps de rétention (t_4) dudit énantiomère E_4 selon l'invention peut varier entre 8,9 min et 9,4 min.

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

Homogénéisation de l'échantillon de foie

On pèse avec précision de l'ordre de 0,525 g ($\pm 0,025$ g) de foie de rat que l'on place dans un tube en polypropylène de 50 mL. On ajoute
25 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
30 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 flocoumafène sur phase solide (« SPE, Solid Phase Extraction »)

On fait passer 1 mL de dichlorométhane (CH_2Cl_2), puis 1 mL de méthanol (CH_3OH), puis 1 mL d'eau ultra-pure (Milli-Q) sur une cartouche Oasis HLB 1cc (WAT094225, Waters). On dépose ensuite l'extrait de foie débarrassé des lipides (1mL MeOH/ H_2O Milli-Q) et contenant le flocoumafène en tête de la cartouche préalablement conditionnée. 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 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 (CH_2Cl_2) et de méthanol (CH_3OH) en proportion volumique de 90/10 et on collecte en bas de cartouche un éluat comprenant le flocoumafène. On évapore le solvant de l'éluat sous un flux d'azote (N_2) à la température de 40°C. On reprend l'échantillon dans 0,5 mL d'acétonitrile ($NC-CH_3$) et on filtre la solution d'acétonitrile contenant le flocoumafène sur filtre de porosité 0,2 μm .

Rémanence hépatique des stéréo-isomères de configuration
du flocoumafène 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 flocoumafène dans un mélange d'huile végétale et de DMSO à 5 % de façon que la quantité de flocoumafène ingérée par chaque rat soit de l'ordre de 2,3 mg par kilogramme de rat. Les rats gavés sont traités quotidiennement par administration par voie sous cutanée d'une dose de vitamine K1 à raison de 1U par rat de façon à maintenir les rats en vie tout au long de l'expérience. Le rapport de la somme des quantités dudit énantiomère E₂ et dudit énantiomère E₃ (diastéréoisomère D_{2,3}) sur la quantité de flocoumafène dans la solution de gavage est de 59% et le rapport de la somme des quantités dudit énantiomère E₁ et dudit énantiomère E₄ (diastéréoisomère D_{1,4}) sur la quantité de flocoumafène dans la solution de gavage est de 41%.

À 1 jour (J+1), 3 jours (J+3) et 7 jours (J+7) après le gavage, on euthanasie 3 rats mâles et 3 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 stéréo-isomères de configuration du flocoumafène présents dans le foie des rats mâles et femelles gavés. Les résultats obtenus sur les rats mâles sont donnés au tableau 1 ci-après et les résultats obtenus sur les rats femelles sont donnés au tableau 2 ci-après dans lesquels les valeurs de la concentration de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène dans le foie sont la moyenne des valeurs mesurées sur 3 rats et exprimées en nanogramme (ng) par gramme de foie.

Concentration hépatique, ng/g	J+1	J+3	J+7
Énantiomère E ₁	196	47	0
Énantiomère E ₂	3904	1962	319
Énantiomère E ₃	3301	1862	647
Énantiomère E ₄	8143	9906	2623

Tableau 1 (rats mâles)

Concentration hépatique, ng/g	J+1	J+3	J+7
Énantionère E ₁	4585	2692	1196
Énantionère E ₂	5396	2522	469
Énantionère E ₃	5478	2734	1228
Énantionère E ₄	10342	7765	5054

Tableau 2 (rats femelles)

La figure 2 représente l'évolution du pourcentage de la quantité massique de chaque énantiomère (E₁ et E₄) du diastéréoisomère D_{1,4} et de chaque énantiomère (E₂ et E₃) du diastéréoisomère D_{2,3} par rapport à la

5 quantité de flocoumafène retenue dans le foie des rats (mâles et femelles) gavés et euthanasiés à J+1, J+3 et J+7. Le pourcentage dudit énantiomère E₁ est représenté par des colonnes à hachures obliques, le pourcentage dudit énantiomère E₄ est représenté par des colonnes à hachures horizontales, le

10 pourcentage dudit énantiomère E₂ est représenté par des colonnes noires et le pourcentage dudit énantiomère E₃ est représenté par des colonnes blanches. Les proportions respectives de chacun des énantiomères (E₁ et E₄) du diastéréoisomère D_{1,4} et des énantiomères (E₂ et E₃) du diastéréoisomère D_{2,3} dans le flocoumafène de la composition de gavage sont représentées en colonne

15 « X » figure 2 et sont de 20,5% pour l'énantiomère E₁, de 20,5% pour l'énantiomères E₄, de 29,5% pour l'énantiomère E₂ du diastéréoisomère D_{2,3} et de 29,5% pour l'énantiomère E₃ du diastéréoisomère D_{2,3}.

La rémanence dudit énantiomère E₂ dans le foie des rats mâles et femelles est inférieure à la rémanence de l'énantiomère E₄ dudit diastéréoisomère D_{1,4} et inférieure à la rémanence du flocoumafène dans le foie

20 des rats. Ledit énantiomère E₂ du flocoumafène est donc susceptible de pouvoir être utilisé à titre de substance rodenticide présentant une toxicité réduite pour l'environnement.

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

25 rodenticide et un procédé de lutte contre des rongeurs cibles nuisibles sont sujets

à des infinités de variantes tant dans la formulation de l'appât rodenticide que dans les modes de mise en œuvre du procédé.

REVENDICATIONS

1/ - Stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₂, du flocoumafène, ledit énantiomère E₂ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t₂ de valeur telle que t₁ < t₂ < t₃ < t₄ ; t₁, t₃ et t₄ représentant les temps de rétention des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E₂, l'analyse chromatographique étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

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

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

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

2/ - Composition comprenant un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₂, du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₂ et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₃, du flocoumafène ;

- ledit énantiomère E₂ présentant, par analyse chromatographique d'une composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t₂ ;

- ledit énantiomère E_3 présentant, par analyse de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t_3 ;

5 t_2 et t_3 étant de valeurs telles que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_1 et t_4 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 , l'analyse chromatographique étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

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

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

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

3/ - Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que la quantité dudit énantiomère E_2 est supérieure à la quantité dudit énantiomère E_3 dans la composition.

25 4/ - Composition selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que le flocoumafène est majoritairement sous forme dudit énantiomère E_3 dans la composition.

5/ - Composition selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité dudit énantiomère E_2 telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition
30 est supérieur à 25%.

6/ - Composition selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité dudit énantiomère E₂ telle que le rapport de cette quantité sur la quantité du flocoumafène dans la composition est supérieur à 95%.

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

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

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

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

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

- un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₂, du flocoumafène, à l'exclusion d'un mélange racémique dudit énantiomère E₂ et d'un stéréo-isomère de configuration, dit énantiomère E₃, du flocoumafène ;

○ ledit énantiomère E₂ présentant, par analyse chromatographique d'une
25 composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de configuration du flocoumafène effectuée dans des conditions décrites ci-après, un temps de rétention t₂ ;

○ ledit énantiomère E₃ présentant, par analyse chromatographique d'une
composition de flocoumafène comprenant quatre stéréo-isomères de
30 configuration du flocoumafène effectuée dans ces mêmes conditions, un temps de rétention t₃ ;

t_2 et t_3 étant de valeurs telles que $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_1 et t_4 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_2 et dudit énantiomère E_3 , ladite analyse étant réalisée à la température de 23,5°C et dans les conditions suivantes :

- 5 ▪ sur une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;
- 10 ▪ en utilisant, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;
- 15 ▪ par injection dans la colonne pour chromatographie d'un volume de 1 μL de composition de flocoumafène à une concentration de 1 μg de flocoumafène par millilitre d'acétonitrile.

11/ - Procédé chromatographique d'obtention dudit énantiomère E_2 selon la revendication 1, dans lequel :

- 20 ▪ on choisit une colonne pour chromatographie liquide à haute pression de dimensions 150 x 2 mm, et comprenant une phase stationnaire chirale constituée de particules de cellulose tris(4-chloro-3-méthylphénylcarbamate), lesdites particules étant d'une taille moyenne de 3 μm et présentant une taille moyenne de pores de 1000 Å ;
- 25 ▪ on choisit, à titre de phase mobile liquide, un mélange formé d'acétonitrile (A) et d'eau comprenant 0,1% en volume d'acide formique (B), avec un rapport volumique A/B de 92/8 et avec un débit de la phase mobile liquide dans la colonne de chromatographie de 0,25 mL/min ;
- 30 ▪ on réalise une séparation des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène à température ambiante lors de laquelle ;
- 30 ▪ on introduit en tête de la colonne pour chromatographie une composition liquide comprenant dudit énantiomère E_2 , puis ;

- on entraîne la composition liquide avec la phase mobile dans la colonne pour chromatographie dans des conditions propres à séparer les stéréo-isomères de configuration du flocoumafène, et on collecte une fraction de la phase mobile comprenant ledit énantiomère E_2 avec un temps de rétention t_2 de valeur telle que
5 $t_1 < t_2 < t_3 < t_4$; t_1 , t_3 et t_4 représentant les temps de rétention de chacun des stéréo-isomères de configuration du flocoumafène distincts dudit énantiomère E_2 , séparément dudit énantiomère E_3 de temps de rétention t_3 , et ;
 - on élimine la phase mobile liquide de ladite fraction de façon à obtenir ledit énantiomère E_2 .

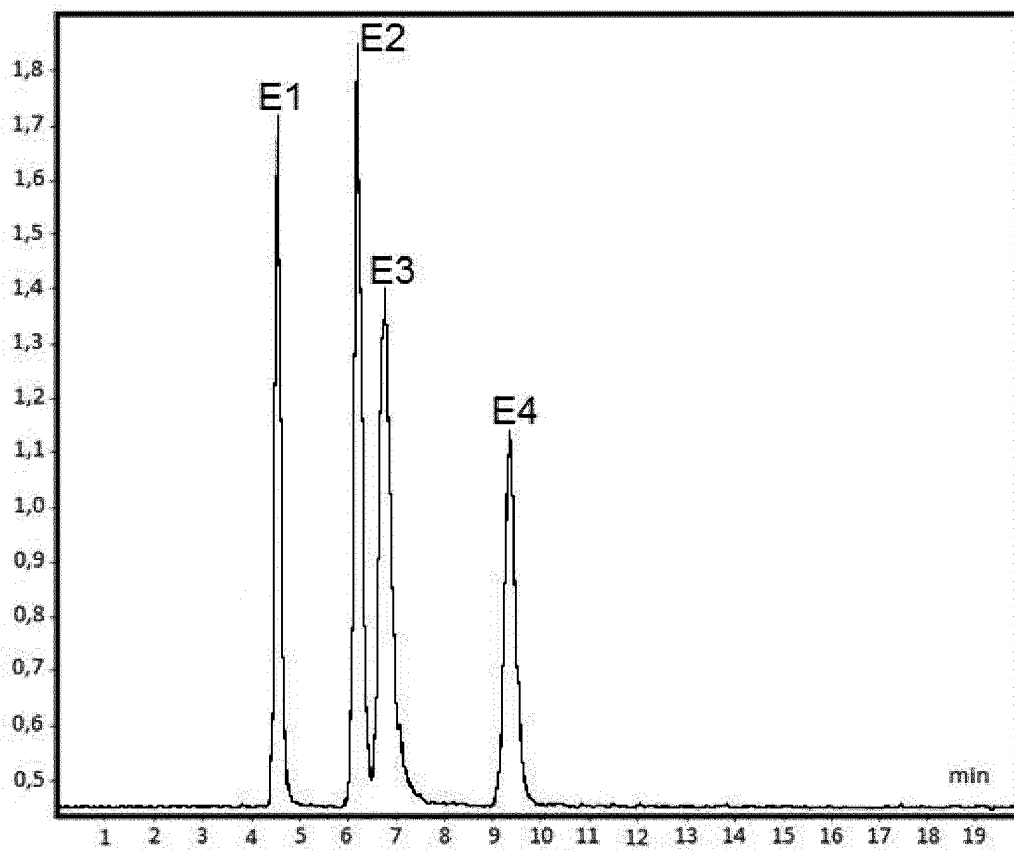


Fig 1

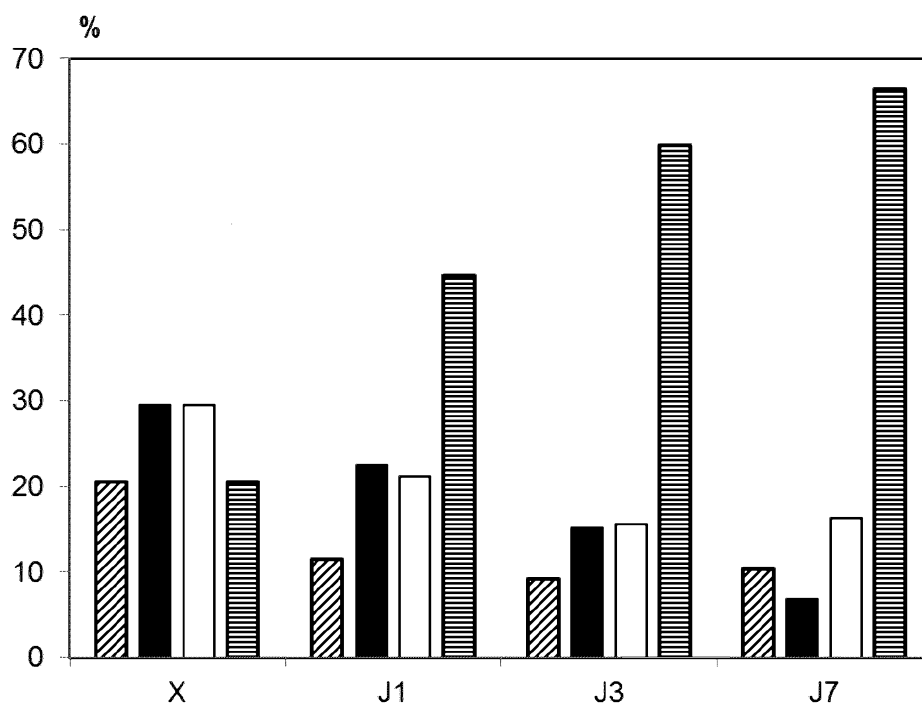


Fig 2

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☒ Le demandeur a maintenu les revendications.

☐ Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

EP 0 147 052 A2 (ICI PLC [GB]) 3 juillet 1985 (1985-07-03)

EP 0 098 629 A1 (SHELL INT RESEARCH [NL]) 18 janvier 1984 (1984-01-18)

EP 0 175 466 A2 (ICI PLC [GB]) 26 mars 1986 (1986-03-26)

JUNG, JAE-CHUL ET AL: "Total synthesis of flocoumafen via Knoevenagel condensation and intramolecular ring cyclization: general access to natural products", MOLECULES, vol. 17, 2012, pages 2091-2102, XP002755590, DOI: 10.3390/MOLECULES17022091

WO 2015/189320 A1 (LIPHATECH [FR]) 17 décembre 2015 (2015-12-17)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT