

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2016/046489 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A01N 43/08 (2006.01) *A01P 7/04* (2006.01)
A01N 65/24 (2009.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/052537

(22) Date de dépôt international :
22 septembre 2015 (22.09.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1458946 23 septembre 2014 (23.09.2014) FR

(71) Déposant : CENTRE NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - [FR/FR]; 3 rue
Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs : FALKOWSKI, Michaël; 8 rue des Cyprès,
F-21110 Aiserey (FR). DE SOUZA RODRIGUES, Alice;
5 rue Rouget de Lisle, F-66650 Banyuls-Sur-Mer (FR).
ÉPARVIER, Véronique; 26 rue du Panorama, F-91190
Gif-Sur-Yvette (FR). DUSFOUR, Isabelle; 13D rue Awa-
ra, F-97354 Rémire-Montjoly (FR). HOUËL, Emeline; 10
lotissement La Colline, F-97354 Rémire-Montjoly (FR).
STIEN, Didier; 5 rue Rouget de Lisle, F-66650 Banyuls-
Sur-Mer (FR).

(74) Mandataire : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES; Bâti-
ment O2, 2 rue Sarah Bernhardt, CS 90017, F-92665 As-
nières-Sur-Seine Cedex (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))



WO 2016/046489 A1

(54) Title : INSECTICIDE PROPERTIES OF AN EXTRACT OF *SEXTONIA RUBRA*, AND THE CONSTITUENTS THEREOF

(54) Titre : PROPRIÉTÉS INSECTICIDES D'UN EXTRAIT DE *SEXTONIA RUBRA*, ET DE SES CONSTITUANTS

(57) Abstract : The invention relates to the use of an extract of *Sextonia rubra* or the constituents thereof, rubrenolide and/or rubry-
nolide, as an insecticide agent against mosquitoes, especially as a larvicide agent.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à l'utilisation d'un extrait de *Sextonia rubra* ou de ses constituants, rubréno-
lide et/ou rubryno-
lide, en tant qu'agent insecticide vis-à-vis des moustiques, en particulier comme agent larvicide.

PROPRIÉTÉS INSECTICIDES D'UN EXTRAIT DE *SEXTONIA RUBRA*, ET DE SES CONSTITUANTS

DESCRIPTION

5

Domaine technique

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'une nouvelle substance d'origine naturelle à activité insecticide, notamment vis-à-vis des insectes nuisibles.

10 En particulier, elle se rapporte à l'utilisation d'un extrait de bois durable amazonien de l'espèce *Sextonia rubra* (Mez) van der Werff (Lauraceae) et/ou d'au moins l'un de ses constituants comme agent insecticide, en particulier pour la lutte contre les larves de moustiques, plus particulièrement du genre Culicidae, plus particulièrement du genre *Aedes*,
15 tout particulièrement de l'espèce de moustique *Aedes aegypti*.

La présente invention concerne en particulier les domaines de la santé publique, phytosanitaire et de l'agrochimie.

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([])
renvoient à la liste des références présentée à la fin du texte.

20

Etat de la technique

Le moustique *Aedes aegypti* est un arthropode de la classe des insectes, de l'ordre des diptères et de la famille des Culicidae. Il est aujourd'hui bien établi dans les régions tropicales et subtropicales,
25 particulièrement dans les zones urbaines. En effet, cette espèce domestique dont les femelles se nourrissent principalement de sang humain se reproduit surtout dans les gîtes créés par l'homme, c'est-à-dire dans tout récipient ou contenant susceptible de retenir l'eau stagnante (gouttières non nettoyées, pneus usés, coupelles de pots de fleurs, etc...).

30 La saison des pluies est très propice à son développement (Simmons et al., N. Engl. J. Med., 366 : 1423-1432, 2012 ; OMS (WHO), Dengue et dengue hémorragique, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/fr/>, 2014) [1, 2].

Ce moustique est considéré comme l'un des vecteurs de maladies
35 les plus importants, notamment pour la transmission d'arboviroses comme

la fièvre jaune ou le chikungunya. Il est aussi le principal vecteur de la dengue. Cette maladie est souvent bénigne bien qu'invalidante, avec des symptômes semblables à ceux des maladies infectieuses. Mais dans certains cas, elle peut se présenter sous une forme plus grave connue sous le nom de dengue hémorragique (1% des cas). Les principales zones d'endémies sont le sud-est asiatique et l'Amérique du Sud. L'incidence de cette maladie vectorielle est en pleine progression ces dernières décennies, et plus de 2,5 milliards de personnes, soit 40% de la population mondiale, sont susceptibles de contracter la dengue. Chaque année, entre 50 et 100 millions de personnes sont infectées dans le monde (OMS (WHO), 2014, précédemment cité) [2]. Des cas importés de dengue et de chikungunya sont également relevés en France métropolitaine, et la surveillance s'accroît dans le sud du pays, du fait de la présence du moustique *Aedes albopictus* (ou moustique tigre), qui est également vecteur de ces maladies.

Il n'existe actuellement aucun traitement ou vaccin contre la dengue ou le chikungunya. Les seuls moyens de contrôle de ces maladies sont la lutte antivectorielle et la protection des personnes. La lutte antivectorielle s'effectue à deux niveaux : la destruction des gîtes larvaires ou leur traitement par un insecticide adapté, et la lutte contre les moustiques adultes (imagocide) via par exemple des pulvérisations intra- et péri-domiciliaires.

Les insecticides actuellement utilisés contre les moustiques sont issus de plusieurs origines : purement synthétique comme le propoxur (carbamate), le dichlorvos (organochloré) ou le malathion (organophosphoré) ; synthétique dérivé d'une origine naturelle, comme les pyréthriinoïdes (deltaméthrine, cyperméthrine, etc...) ; ou d'origine naturelle (pyrèthre, spinosad, Bti).

Cependant, un usage massif et parfois non raisonné des insecticides a conduit au développement de résistances dans les populations d'*Aedes aegypti*. A l'échelle mondiale, une première campagne d'éradication d'*Aedes aegypti* à base d'insecticides organochlorés, DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) et dieldrine, avait été mise en oeuvre dans les années 40. La campagne fut réussie dans les régions d'Europe du Sud, d'Afrique et d'Amérique du Nord traitées au DDT. Cependant dans

les années 60 et 70, à l'arrêt du programme, une réinfestation progressive des territoires a été observée, les moustiques ayant développé une résistance à cette famille d'insecticides. Ce phénomène a été particulièrement observé en Guyane. (Jansen et Beebe, *Microbes Infect.*, 12(4) : 272-279, 2010 ; Fouque et Carinci, *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 89(2) : 115-119, 1996) [10, 11].

Actuellement en Guyane, l'ensemble des populations du moustique est maintenant résistant à la deltaméthrine, un pyréthrianoïde utilisé pour la lutte contre les *Aedes aegypti* adultes, ainsi qu'au fénitrothion, un organophosphoré aujourd'hui interdit (Dusfour et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106 : 346-352, 2011) [3].

La lutte contre *Aedes aegypti*, le vecteur de la dengue en Guyane, est menée par les services de démoustication du Conseil général de la Guyane. Celle-ci repose en ce qui concerne la lutte antilarvaire sur le traitement des gîtes larvaires de manière mécanique ou chimique avec une formulation en granulés de *Bacillus thuringiensis var israelensis* ou Bti (Vectobac®G). Aucune résistance au Bti (formulation d'origine naturelle produite par la bactérie Gram positif *Bacillus thuringiensis var. israelensis* ou Bti et dont l'activité provient de la toxine thuringiensine), utilisé en Guyane pour la lutte larvicide, n'existe actuellement. Cependant, ce produit possède une très faible rémanence dans l'environnement (15 jours à 2 mois en fonction de la charge en matière organique, l'exposition aux UV, lessivage, etc...), limitant son action dans le temps et ne permettant donc pas de prévoir de façon fiable sa durée d'action. D'autres larvicides ont des contraintes d'utilisation pour limiter les effets sur les espèces non cibles. Il s'agit par exemple du spinosad produit par *Saccharopolyspora spinosa* et constitué de deux toxines (spinosyne A et D), mais commercialisé avec des restrictions du fait de sa forte toxicité sur les abeilles. En outre, l'usage de pesticides, en particulier des produits de synthèse (tels que les organochlorés comme le DDT, les organophosphorés et les carbamates) a provoqué d'autres dommages, notamment une contamination des sols par les molécules trop fortement rémanentes (par exemple le chlordécone aux Antilles) ainsi que des effets nocifs sur les organismes non cibles (Regnault-Roger et al., *Biopesticides d'origine végétale*, Paris : Tec & Doc Lavoisier, 2008) [4]. Ces difficultés touchent également les substances

larvicides, dont le nombre est en diminution. Par exemple, le dichlorvos a été jugé comportant un risque inacceptable pour la santé humaine et l'environnement et ne sera pas ajouté aux Annexes I, IA ou IB de la Directive 98/8/EC. Son interdiction a pris effet le 1^{er} mai 2013.

5 Ainsi la réglementation européenne réduit année après année le nombre de ces molécules du fait de leur toxicité ou bien par le non renouvellement de leurs autorisations de mise sur le marché (AMM). Les dernières molécules autorisées sont les pyréthriinoïdes. Les larvicides sont plus divers dont le Bti, le spinosad ; le méthoprène, la pyriproxifène
10 (inhibiteurs de croissance), etc... mais pour certains leur rémanence et les restrictions d'utilisation ne sont pas optimales pour leur utilisation en lutte antivectorielle ou antimoustique ; pour d'autres le développement de résistance a d'ores et déjà été observé.

 Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles solutions en vue de
15 remplacer ces insecticides palliant les défauts, inconvénients et obstacles de l'art antérieur. En particulier, des substances plus écologiques comme les biopesticides, les molécules issues de produits naturels tels que les plantes ou les microorganismes, semblent représenter une alternative prometteuse.

20 Par exemple, le bois est un matériau très compétitif par rapport à d'autres : il est renouvelable, biodégradable, peu consommateur d'énergie lors de sa transformation et il participe au stockage du carbone. la valorisation de cette matière première présente donc des avantages d'un point de vue écologique et économique. En particulier *Sextonia rubra* est
25 une espèce forestière plutôt fréquente sur le plateau des Guyanes, où il est connu sous le nom de grignon franc, et en Amazonie brésilienne (Van der Weff, Novon, 7 : 436-439, 1997) [5]. En Guyane, son bois est largement exploité en menuiserie. Il représente 9% de la population des grumes dans le département. De façon générale, il est important de noter qu'entre
30 l'abattage et le sciage plus de 50% de la matière ligneuse est perdue, ce qui représente une grande quantité de déchet produite par le secteur de la filière bois (Rodrigues, Analyse et valorisation bioinspirée des métabolites secondaires à l'origine de la durabilité naturelle des bois exploités de Guyane française, Thèse de doctorat, 2010) [6]. A ce jour, seule une
35 activité termiticide vis-à-vis des termites *Nasutitermes macrocephalus* a été

décrite pour un extrait de *Sextonia rubra* à l'acétate d'éthyle ainsi que pour l'un de ses constituants (rubrynolide) (Rodrigues et al., Pest. Manag. Sci., 67 : 1420-1423, 2011) [7], ainsi qu'une activité fongicide vis-à-vis des champignons du bois (Demande de Brevet FR 2959642) [8]. Toutefois, ces rémanents de l'industrie forestière (ou déchets de scieries) ne sont actuellement pas valorisés en Guyane.

Description de l'invention

Les Inventeurs ont maintenant mis en évidence de manière tout à fait inattendue de nouveaux produits insecticides, en particulier larvicides, extraits à partir de l'espèce de bois *Sextonia rubra*, vis-à-vis des Culicidae formant une famille d'insectes communément appelés moustiques, plus particulièrement vis-à-vis du genre *Aedes*, préférentiellement vis-à-vis de l'espèce *Aedes aegypti*.

Ainsi l'extrait acétate d'éthyle de *Sextonia rubra* ainsi que ses deux constituants (rubrénolide et rubrynolide) pris indépendamment ont démontré au laboratoire une excellente activité larvicide vis-à-vis du moustique *Aedes aegypti*, avec en particulier une DL50 (dose létale médiane) de 3,15 µg/ml à 24h sur la souche de laboratoire PAEA, et des DL50 de 0,6 et 3,8 µg/ml pour le rubrénolide et le rubrynolide, respectivement, sur cette même souche.

Les avantages quant à la production et l'utilisation de ces nouveaux agents insecticides vis-à-vis du moustique sont multiples : efficacité, renouvelable, meilleure biodégradabilité en général, un meilleur bilan CO₂, pas de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire, pas de persistance dans l'environnement et un rapport prix/performance très acceptable. En outre, ces produits naturels n'induisent pas de surexploitation forestière puisqu'ils peuvent être préparés à partir des déchets d'exploitation forestière qui actuellement ne sont pas valorisés.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'une composition comprenant un extrait de *Sextonia rubra* ou l'un de ses constituants (rubrénolide et/ou rubrynolide) en tant qu'agent insecticide vis-à-vis des Culicidae (ou moustiques), en particulier en tant qu'agent larvicide, plus particulièrement vis-à-vis des moustiques du genre *Aedes*, préférentiellement vis-à-vis de l'espèce *Aedes aegypti*.

On entend par « agent insecticide/larvicide vis-à-vis d'une souche de moustique » au sens de la présente invention, un composé conduisant à une mortalité des larves de moustiques mises en présence de ce composé, par exemple dans le cadre d'un essai en gobelets réalisés
5 suivant le protocole recommandé par l'OMS (Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 2005) [12], et pour lequel, selon les critères de l'OMS pour valider les tests, la mortalité dans les lots témoin est inférieure à 20%.

10 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, on entend par « extrait de *Sextonia rubra* » au sens de la présente invention, un extrait brut de *Sextonia rubra* ou un extrait comprenant au moins l'un de ses constituants, à savoir le rubrynolide et/ou le rubrényolide, qui peuvent être utilisés comme agent insecticide dans le cadre de la présente invention.

15 Lesdits extraits de bois durables amazoniens sont obtenus à partir de déchets d'exploitation forestière par n'importe quel solvant et méthode appropriés, y compris des méthodes d'extraction par solvant, ou de nouvelles technologies d'extraction (CO₂, supercritique, micro-ondes, ultrasons, etc...). Le procédé d'extraction n'est pas critique, et peut être
20 sélectionné par l'homme du métier en fonction de la concentration en extractibles souhaitée, et du type de produit larvicide attendu. De préférence, les extraits de bois durable amazonien sont obtenus par un procédé d'extraction par solvant, préférentiellement par solvant polaire. On entend par « solvant polaire » au sens de la présente invention, un solvant
25 présentant un moment dipolaire différent de zéro, et en particulier supérieur à 1,5. Par exemple, le solvant polaire est un solvant protique tel que l'eau ou un alcool (méthanol, éthanol, etc..) ou un mélange de ceux-ci par exemple hydroalcoolique, ou un solvant aprotique tel qu'un ester (acétate d'éthyle, etc.)

30 Par exemple, la méthode d'extraction utilisée est la macération dans un solvant polaire (eau ; alcool par exemple méthanol, éthanol ; mélange hydroalcoolique ; ester par exemple acétate d'éthyle, etc...), pendant 12 à 72 heures, de préférence pendant 24 heures, à une température de 22 à 27 °C, de préférence à température ambiante (25°C). Pour ce faire un
35 volume de 2 à 5 litres de solvant, de préférence d'environ 3 litres de

solvant est utilisé pour 300 à 1000 g de copeaux de bois, de préférence pour environ 800 g de copeaux de bois.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'extrait de *Sextonia* est un extrait acétate d'éthyle.

5 La présente invention a encore pour objet un procédé de traitement larvicide, ledit procédé comprenant l'application d'une quantité efficace d'une composition comprenant un extrait de *Sextonia rubra*, du rubrynolide et/ou du rubrérolide sur les gîtes larvaires.

10 On entend par « quantité efficace » au sens de la présente invention, une dose conduisant à 100% de mortalité des larves étudiées, afin d'éviter tout développement des phénomènes de résistance. Par exemple, la concentration minimale correspondant à une quantité efficace est donc de 18 µg/ml (ppm) pour l'extrait de *Sextonia rubra* pour obtenir 100% de mortalité à 24h. Concernant le rubrérolide, cette valeur est de 2 µg/ml à 15 24h. Concernant le rubrynolide, cette valeur est de 17 µg/ml à 24h.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de l'invention, l'application est réalisée par pulvérisation. Par exemple, l'extrait de *Sextonia rubra*, du rubrynolide et/ou du rubrérolide est(sont) dissous dans de l'éthanol puis dilué(s) dans de l'eau jusqu'à l'obtention de la 20 concentration souhaitée, puis ces préparations hydro-alcooliques sont ensuite pulvérisées sur les gîtes larvaires.

D'autres avantages pourront encore apparaître à l'homme du métier à la lecture des exemples ci-dessous.

25

EXEMPLES

30 **EXEMPLE 1 : PREPARATION D'EXTRAITS BRUTS DE SEXTONIA RUBRA, A PARTIR DESQUELS SONT EXTRAITS SES CONSTITUANTS**

Extrait acétate d'éthyle

Un extrait acétate d'éthyle de *Sextonia rubra* a été obtenu selon la procédure précédemment décrite dans Rodrigues et al. (2010,

précédemment cité) [6] par macération dans le solvant de bois préalablement séché à température ambiante et broyé.

Pour ce faire, la poudre de bois de *Sextonia rubra* (200g) a été placée dans un erlenmeyer et extraite (3 x 500ml d'acétate d'éthyle) sous agitation, à température ambiante pendant 48h. Après chaque extraction, la solution a été filtrée, les solutions issues des différentes extractions ont été combinées, et le solvant a été évaporé sous pression réduite à une température de 30°C. Le rendement obtenu pour l'extrait a été de 4,2%.

L'extrait (3,6g) a ensuite été purifié selon une méthode précédemment décrite dans Rodrigues et al. (2010, précédemment cité) [6], par chromatographie sur colonne ouverte de silice en utilisant comme éluant l'acétate d'éthyle (600ml) puis le méthanol (rinçage). L'éluat obtenu avec l'acétate d'éthyle a ensuite été évaporé (obtention de 3,0g de résidu beige), et trituré avec de l'hexane. La fraction insoluble a ensuite été récupérée par filtration et séchée sous vide (316,6mg). Cette fraction contient un mélange de rubrénolide et de rubrynlolide. La séparation des deux constituants a ensuite été effectuée selon la procédure décrite dans Thijs et Zwanenburg (Tetrahedron, 60 : 5237-5252, 2004) [9]. Le mélange a été dissout dans 6,5ml d'éthanol absolu. Une solution de nitrate d'argent (1g dans 15ml d'éthanol) a ensuite été ajoutée. L'ensemble a été laissé à précipiter pendant 4h. Le précipité (contenant le rubrynlolide à purifier) a ensuite été récupéré par filtration et séché sous vide. Le filtrat a été évaporé sous pression réduite pour conduire au rubrénolide à purifier. Le précipité contenant le rubrynlolide a été dissout dans 5ml de solution de cyanure de sodium (NaCN) et le mélange a été extrait avec 10ml d'éther diéthylique. La phase organique a été séchée au sulfate de magnésium (Mg_2SO_4), filtrée, et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le rubrynlolide pur a ainsi été obtenu (21,6mg). Le résidu sec obtenu à partir du filtrat a été repris dans 80ml d'eau MilliQ et extrait avec 80ml d'éther diéthylique. La phase organique contenant un précipité jaune a été récupérée, filtrée et séchée une fois limpide sur sulfate de magnésium avant d'être à nouveau filtrée. Après évaporation du solvant, 106,8mg de rubrénolide pur ont été obtenus.

L'acétate d'éthyle utilisé pour l'extraction ne présente pas de toxicité, les seuls risques relevés étant des irritations des yeux, des somnolences ou des vertiges. L'emploi de ce solvant permet donc d'obtenir un extrait dans de bonnes conditions de sécurité. Enfin, les rendements de l'extrait brut >4%, de l'extrait du rubrynolide de 0,6% et de l'extrait du rubrénolide (molécule la plus active) de 2,9% obtenus, font de ce procédé d'extraction par macération un procédé simple à mettre en œuvre et efficace en termes de rendement ; ce qui permet d'envisager favorablement un passage à l'échelle industrielle en ce qui concerne la production de l'extrait et de ses composés.

Extraits alcooliques

Des extraits alcooliques de *Sextonia rubra* ont été obtenus par macération dans le méthanol ou l'éthanol de bois préalablement séché à température ambiante et broyé.

Pour ce faire, des copeaux de bois de *Sextonia rubra* (200mg) ont été mis à macérer dans 5 ml de chacun des solvants choisis, à température ambiante. Le mélange a alors été placé dans un bain à ultrasons pendant 4 x 15 minutes, puis centrifugé et filtré afin de récupérer la solution. Le solvant a été évaporé sous pression réduite à une température de 30°C.

Les rendements d'extraction obtenus pour les différents solvants sont les suivants : éthanol, 4,6% ; méthanol, 5,1%. Un extrait acétate d'éthyle a été obtenu dans les mêmes conditions et un rendement d'extraction de 4,2% a été obtenu.

La composition relative des extraits remis en suspension dans le méthanol a ensuite été analysée par chromatographie liquide haute performance (CLPH) en utilisant une colonne de type C18 et un gradient eau/acétonitrile additionné de 0,1% d'acide formique pour l'élution. Par comparaison avec des standards, le rubrénolide et le rubrynolide ont été identifiés grâce à un détecteur à diffusion de lumière (DEDL), et les aires respectives des pics correspondants ont été mesurées. Cette analyse a permis de mettre en évidence que les extraits sont quasi-exclusivement composés de ces deux composés. Les proportions relatives de chacun des

composés dans les différents extraits obtenus ont ainsi été calculées. Les résultats suivants ont été obtenus :

Extraits	Proportions relatives des composés (%)	
	rubrynlolide	rubrénlolide
Ethanol	69	28
Méthanol	64	32
Acétate d'éthyle	70	27

Les proportions relatives en rubrynlolide et rubrénlolide dans les trois extraits sont équivalentes. Dans la mesure où il a été précédemment démontré que cette activité est associée à ces deux composés, ces extraits doivent présenter des activités larvicides équivalentes.

Il est à noter que même si le méthanol permet d'obtenir un rendement >5%, légèrement supérieur aux deux autres solvants, il présente un risque de toxicité par inhalation, par contact cutané et en cas d'ingestion qui nécessite des précautions supplémentaires lors de sa manipulation en laboratoire.

En revanche tout comme l'acétate d'éthyle, l'éthanol utilisé pour l'extraction ne présente pas de problèmes majeurs de toxicité lors de la manipulation au laboratoire, les seuls risques relevés étant des irritations des yeux et des somnolences. L'emploi de ces solvants permet donc d'obtenir des extraits dans de bonnes conditions de sécurité. Enfin, les rendements des extraits bruts >4% et les proportions en rubrynlolide et rubrénlolide obtenus, font de ce procédé d'extraction par macération un procédé simple à mettre en œuvre et efficace ; ce qui permet d'envisager favorablement un passage à l'échelle industrielle en ce qui concerne la production des extraits et de ses composés.

EXEMPLE 2 : ACTIVITE INSECTICIDE DE L'EXTRAIT ACETATE D'ETHYLE DE SEXTONIA RUBRA, ET DE SES CONSTITUANTS

Les essais biologiques ont été réalisés sur larves de moustiques *Aedes aegypti* de la souche de laboratoire PAEA sensible à tous les insecticides. Le protocole décrit ci-après a été adapté d'après les protocoles de l'OMS.

Cette souche originaire de Polynésie française, est maintenue depuis une dizaine d'années à l'insectarium de l'Institut Pasteur de la Guyane, à Cayenne. L'élevage des moustiques a été réalisé en conditions naturelles : température de $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, humidité de $80\%\pm 20\%$, et durée du jour 12:12h \pm 20min au cours de l'année. Les œufs d'*Aedes aegypti* ont été maintenus secs sur des bandes de papier buvard à la température de l'insectarium. L'éclosion a été réalisée en plaçant ces bandes dans l'eau sous une cloche à vide pendant au moins 20min. Les larves ainsi obtenues ont été nourries avec des comprimés de levure. Les larves au stade 3-4^{ème} stade de croissance ont ensuite été utilisées pour les essais d'activité des extraits et constituants. 100 larves ont été transférées dans des gobelets en plastique contenant 99ml d'eau distillée. Quatre gobelets par concentration (4 x 25 larves) et au moins 5 concentrations de chaque extrait ou constituant dilué dans l'éthanol (extrait brut de *Sextonia rubra* : 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 25, 35, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$; rubrérolide : 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 1,5, 2 $\mu\text{g/ml}$; rubryrolide : 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 1,5, , 4, 6, 8 $\mu\text{g/ml}$) ont été utilisés pour mesurer des mortalités allant de 0 à 100%. Chaque concentration d'extrait ou de constituant (1ml) a été ajoutée dans le gobelet. Des témoins ont également été réalisés en ajoutant au gobelet 1ml d'éthanol. La mortalité a été évaluée à 24h et 48h après exposition des larves au produit à tester (extrait brut, constituant isolé, éthanol).

Les valeurs de mortalité suivantes (en $\mu\text{g/ml}$, équivalent ppm) ont été obtenues :

Extrait/Constituant	A 24h		A 48h	
	DL50 (ES)	LD90 (ES)	LD50 (ES)	LD90 (ES)
<i>Sextonia rubra</i>	3,150 (0,018)	8,442 (0,029)	2,062 (0,018)	4,513 (0,022)
Rubrérolide	0,605 (0,023)	2,110 (0,041)	0,300(0,024)	0,788 (0,027)
Rubryrolide	3,840 (0,018)	8,909 (0,031)	2,105 (0,023)	8,200 (0,043)
Dichlorvos	0,039 (0,012)	0,064 (0,026)	0,029 (0,012)	0,049 (0,020)
Spinosad	0,387 (0,025)	1,118 (0,065)	0,193 (0,020)	0,444 (0,028)

Témoin négatif [éthanol à 1 % en volume (1ml d'éthanol ajouté à 99 ml d'eau)] : mortalité moyenne sur 100 larves : A 24h, moyenne 0,63 % (ES 0,52%), à 48h moyenne 1,75 % (ES 1,11%).

5 Les valeurs obtenues, en particulier pour le rubrénilide, sont dans la même gamme que celles obtenues pour le spinosad (DL50 à 24h de 0,6µg/ml pour le rubrénilide contre 0,4µg/ml pour le spinosad).

10 En comparaison, en Guyane, la lutte antilarvaire repose sur le traitement des gîtes de manière mécanique ou chimique avec une formulation en granulés de *Bacillus thuringiensis var. israeliensis* ou Bti (Vectobac®G). Ce produit n'a pas été testé dans le cadre de la présente étude, mais des expériences menées à l'Institut Pasteur de la Guyane ont démontré pour cette formulation des valeurs de DL50 à 24h de 0,11µg/ml et des valeurs de DL95 à 24h de 0,22µg/ml, sur la souche PAEA.

15 Il ressort de la présente étude que l'extrait acétate d'éthyle de *Sextonia rubra* présente une activité larvicide, en particulier vis-à-vis des larves du moustique *Aedes aegypti*. De plus, le rubrénilide issu de l'extrait acétate d'éthyle de bois de *Sextonia rubra*, conduit à des mortalités sur les larves de la souche PAEA du même ordre de grandeur ou meilleures que celles obtenues pour des produits connus pour leur activité larvicide,
20 comme le spinosad ou le Bti utilisé comme traitement antilarvaire en Guyane.

Listes des références

- 1) Simmons et al., N. Engl. J. Med., 366 : 1423-1432, 2012
- 2) OMS (WHO), Dengue et dengue hémorragique,
5 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/fr/>, 2014
- 3) Dusfour et al., Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 106 : 346-352, 2011
- 4) Regnault-Roger et al., Biopesticides d'origine végétale, Paris : Tec &
Doc Lavoisier, 2008
- 5) Van der Weff, Novon, 7 : 436-439, 1997
- 10 6) Rodrigues, Analyse et valorisation bioinspirée des métabolites
secondaires à l'origine de la durabilité naturelle des bois exploités de
Guyane française, Thèse de doctorat, 2010
- 7) Rodrigues et al., Pest. Manag. Sci., 67 : 1420-1423, 2011
- 8) Demande de Brevet FR 2959642
- 15 9) Thijs et Zwanenburg, Tetrahedron, 60 : 5237-5252, 2004
- 10) Jansen et Beebe, Microbes Infect., 12(4) : 272-279, 2010
- 11) Fouque et Carincil, Bull. Soc. Pathol. Exot., 89(2) : 115-119, 1996
- 12) OMS (WHO), Guidelines for Laboratory and Field Testing of
Mosquito Larvicides, WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 2005

REVENDICATIONS

- 1) Utilisation d'une composition comprenant un extrait brut de *Sextonia rubra*, du rubrynolide et/ou du rubrénolide en tant qu'agent insecticide vis-à-vis d'une souche de moustique.
- 2) Utilisation selon la revendication 1, où l'agent insecticide est un agent larvicide.
- 3) Utilisation selon la revendication 1 ou 2, où la souche de moustique est choisie parmi la famille des Culicidae.
- 4) Utilisation selon la revendication 3, où la souche de moustique est du genre *Aedes*.
- 5) Utilisation selon la revendication 4, où la souche de moustique est l'espèce *Aedes aegypti*.
- 6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, où l'extrait brut de *Sextonia rubra* est un extrait acétate d'éthyle.
- 7) Procédé de traitement larvicide, ledit procédé comprenant l'application d'une quantité efficace d'une composition comprenant un extrait brut de *Sextonia rubra*, du rubrynolide et/ou du rubrénolide sur les gîtes larvaires.
- 8) Procédé selon la revendication 6, où l'application se fait par pulvérisation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01N43/08 A01N65/24 A01P7/04
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALICE MS RODRIGUES ET AL: "The termiticidal activity of Sextonia rubra (Mez) van der Werff (Lauraceae) extract and its active constituent rubrynolide", PEST MANAGEMENT SCIENCE, vol. 67, no. 11, 26 November 2011 (2011-11-26), pages 1420-1423, XP055189766, ISSN: 1526-498X, DOI: 10.1002/ps.2167 cited in the application abstract figure 3; table 1	1-8
A	WO 2011/138570 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; INST RECH DEVELOPPEMENT IRD [FR]; STIEN D) 10 November 2011 (2011-11-10) cited in the application abstract; examples	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 26 November 2015	Date of mailing of the international search report 05/01/2016
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Molina de Alba, José
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052537

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>N C Franca ET AL: "Rubrenolide and rubrymolide: An alkylene-alkyne pair from Nectandra rubra*", Phytochemistry, 1 January 1977 (1977-01-01), pages 257-262, XP055189760, Retrieved from the Internet: URL:http://ac.els-cdn.com/S0031942200867977/1-s2.0-S0031942200867977-main.pdf?_tid=8d73b4ba-fd65-11e4-8d4d-00000aab0f02&acdnat=1431957513_642b120115df4e16b9ddd31b30855b35 [retrieved on 2015-05-18] abstract -----</p>	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/052537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011138570 A1	10-11-2011	FR 2959642 A1	11-11-2011
		WO 2011138570 A1	10-11-2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/052537

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A01N43/08 A01N65/24 A01P7/04 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ALICE MS RODRIGUES ET AL: "The termiticidal activity of Sextonia rubra (Mez) van der Werff (Lauraceae) extract and its active constituent rubrynolide", PEST MANAGEMENT SCIENCE, vol. 67, no. 11, 26 novembre 2011 (2011-11-26), pages 1420-1423, XP055189766, ISSN: 1526-498X, DOI: 10.1002/ps.2167 cité dans la demande abrégé figure 3; tableau 1	1-8
A	WO 2011/138570 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; INST RECH DEVELOPPEMENT IRD [FR]; STIEN D) 10 novembre 2011 (2011-11-10) cité dans la demande abrégé; exemples	1-8
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">26 novembre 2015</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">05/01/2016</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Molina de Alba, José</div>

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>N C Franca ET AL: "Rubrenolide and rubrymolide: An alkylene-alkyne pair from Nectandra rubra*", Phytochemistry, 1 janvier 1977 (1977-01-01), pages 257-262, XP055189760, Extrait de l'Internet: URL:http://ac.els-cdn.com/S0031942200867977/1-s2.0-S0031942200867977-main.pdf?_tid=8d73b4ba-fd65-11e4-8d4d-00000aab0f02&acdnat=1431957513_642b120115df4e16b9ddd31b30855b35 [extrait le 2015-05-18] abrégé</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/052537

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2011138570 A1	10-11-2011	FR 2959642 A1	11-11-2011
		WO 2011138570 A1	10-11-2011
